HÄMOCYANIN IN DER HÄMOLYMPHE ZWEIER SPINNEN, DUGESIELLA CALIFORNICA UND CUPIENNIUS SALEI KEYSERLING

Renate Loewe

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0018

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

HÄMOCYANIN IN DER HÄMOLYMPHE ZWEIER SPINNEN, DUGESIELLA CALIFORNICA UND CUPIENNIUS SALEI KEYSERLING

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig - Maximilians - Universität

zu München

vorgelegt

von

Renate Loewe

aus

Würzburg

Januar 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
Tag der mündlichen Prüfung: 29. 2. 1972

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Linzen durchgeführt. Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. H. Autrum für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. B. Linzen, der diese Arbeit durch sein starkes Interesse, seine Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen sehr gefördert hat, bin ich zu tiefem Dank verbunden.

Sehr bedanken darf ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Engel (Max-Planck-Institut für Eiweiß und Leder) für die Bereitstellung der analytischen Ultrazentrifuge und bei Frau Ch. Strauch, die mich in ihre Methodik eingearbeitet hat.

Mein besonderer Dank gilt Frl. S. Döhring (Max-Planck-Institut für Biochemie), die die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Spinnenhämolymphe gemacht hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei Frau S. Jahn, Frl. H. Boenke, meinen Kollegen und bei meinen Mann.

I N H A L T S A N G A B E

EINLEITUNG Seite 1

MATERIAL UND METHODEN 3

Chemikalien 3
Tiere und Tierhaltung 3
Entnahme der Hämolymphe 4
Puffer 4
Quantitative Bestimmungen 4
Proteineichkurven 5
Messung von Sauerstoffbindungskurven 5
Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge 9
Ergänzende Versuche 10
Isoelektrofokussierung 11
Elektrophoresen 11
Elektronenmikroskopie 12

DISKUSSION DER METHODEN 13

Hämolympheentnahme 13
Sauerstoffbindungskurven 13
SDS-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung 14

ERGEBNISSE 15

1. Einige grundlegende Eigenschaften der Hämolymphe 15
2. Die Sauerstoffbindungskurven 17
   a) Abhängigkeit von der Temperatur 19
   b) Abhängigkeit vom pH-Wert 19
   c) Der Quotient E^{max}_{340} / E_{278} 22
   d) Der Hill-Parameter n als Maß für die Kooperativität 24
3. Der Aufbau des Hämocyanins aus Untereinheiten 26
   a) Zur Frage der Einheitlichkeit der Hämolympheproteine 26

b) Die kleinste funktionelle Einheit Seite 31
c) Das Verhalten des Hämocyanins in der analytischen Ultrazentrifuge 32
4. Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichte in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Anwesenheit von Mg^{++} 38
a) Dugesiella 38
b) Cupiennius 39
c) Vergleich zwischen Hämocyanin und Apohämocyanin 41
d) Reaggregationsversuche bei Dugesiella 41
5. Elektronenmikroskopie 42

DISKUSSION

1. Respiratorische Eigenschaften 44
2. Einheitlichkeit der Hämolympheproteine 51
3. Hämocyaninkomponenten 52
4. Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht 53
5. Elektronenmikroskopie 54
6. Die respiratorische Bedeutung des Spinnenhämocyanins 55

ZUSAMMENFASSUNG 60

LITERATURVERZEICHNIS 62

ANHANG: 4 Photoseiten

E I N L E I T U N G

Hämocyanin wird in der Hämolymphe zahlreicher Arthropoden und Mollusken gefunden. Seine Bedeutung als respiratorisches Pigment erscheint heute weitgehend anerkannt (REDMOND in GHIRETTI, 1968). Die respiratorischen Eigenschaften der Hämocyanine zeigen eine große Variationsbreite, und müssen als Adaption an unterschiedliche Umweltbedingungen und Lebensformen verstanden werden. Voraussetzung für die respiratorische Funktion ist die Fähigkeit, Sauerstoff reversibel zu binden. Sauerstoffaufnahme und -abgabe werden durch intramolekulare Wechselwirkungen (Bohreffekt, Kooperativität) modifiziert. Diese intramolekularen Wechselwirkungen sind mit allosterischen Effekten gleichzusetzen. Ihre Untersuchung gestaltet sich am Beispiel der respiratorischen Proteine besonders einfach: Das System besteht nur aus dem respiratorischen Pigment, dem Substrat Sauerstoff und einer Reihe von Effektoren (H^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Stoffwechselmetabolite); das Substrat tritt am respiratorischen Pigment nicht in eine chemische Reaktion ein; damit entfällt auch die Komplikation durch Rückreaktion des "Produkts". Die auftretenden intramolekularen Wechselwirkungen sind homotrop oder heterotrop, je nachdem, ob sich gleichartige oder unterschiedliche Bindungsstellen gegenseitig beeinflussen, wobei wiederum zwischen negativer und positiver Beeinflussung zu unterscheiden ist.

Hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus lassen sich die Hämocyanine in zwei große Gruppen einteilen, die der Arthropoden und der Mollusken. Diese unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau signifikant, lassen aber innerhalb jedes Stammes gleiche Bauprinzipien erkennen. Die Hämocyanine der Mollusken erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als zylindrische Strukturen, die aus drei (Loligo) bis zwölf (Busycon) ringförmigen Untereinheiten aufgebaut sind; ihre Molekulargewichte sind die

---

Liste der im Text erscheinenden Abkürzungen:

SDS = Natrium-Dodecylsulfat

TCE = Trichloressigsäure

höchsten unter den Hämocyaninen, sie reichen bis zu 9 000 000 Dalton. Die Arthropodenhämocyanine zeigen dagegen ein anderes Bauprinzip: Sie bauen sich blockartig durch Dimerisation bzw. Tetramerisation aus einem Monomeren auf (Molekulargewicht des Monomeren etwa 500 000 Dalton). Während es bei den bisher untersuchten Crustaceen über das dimere Molekül hinaus keine höhermolekularen Komponenten gibt, schreitet die Assoziation bei Limulus bis zum Tetramer fort; darüber hinaus werden bei dieser Art noch Octamere gefunden (FERNÁNDEZ-MORÁN et al., 1966). Alle Hämocyaninkomponenten stehen miteinander in einem von verschiedenen Parametern abhängigen Gleichgewicht. Trotz intensiver Arbeit zahlreicher Laboratorien sind bis heute aber wesentliche Fragen ungeklärt, betreffend die Wertigkeit des Kupfers bei der Oxygenierung, Struktur der sauerstoffbindenden Zentren, Größe und Zahl der funktionellen Untereinheiten und ihrer Polypeptidketten, Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der Moleküle..

Bis jetzt beruhen fast alle Kenntnisse über Arthropodenhämocyanin auf Untersuchungen an dekapoden Krebsen und an Limulus. Über die Eigenschaften der Hämocyanine in einer weiteren großen Arthropodengruppe, der meist terrestrischen Arachniden gibt es fast keine Information. PADMANABHANAIDU (1966) hat die Sauerstoffbindung am Hämocyanin des Skorpions Heterometrus fulvipes untersucht, VAN BRUGGEN (in GHIRETTI, 1968) zwei elektronenmikroskopische Bilder von Hämocyaninen einer Vogelspinne und eines Skorpions publiziert. Bei der Analyse der Hämolymphe zweier Spinnen, Dugesiella californica und Cupiennius salei, hatte sich ergeben, daß sie als Hauptbestandteil ein stark kupferhaltiges Protein enthielt, dessen Spektrum es als Hämocyanin auswies. Im Gegensatz zu anderen Arthropoden ist bei den Spinnen die Stoffwechselphysiologie so gut wie nicht untersucht worden. Nach der chemischen Analyse der Hämolymphe (LOEWE, LINZEN, v. STACKELBERG, 1970) schien es sinnvoll, das Hämocyanin näher zu untersuchen, zumal sich abschätzen läßt, daß es bei Cupiennius-Weibchen ca. 20 % des Gesamtproteins eines Tieres bestreitet. Angesichts der zahlreichen, eben genannten, noch offenen Probleme bei Hämocyaninen, erhöht jedes weitere untersuchte Hämocyanin außerdem die Chance, für die eine oder andere Frage günstigere Versuchsbedingungen zu finden.

Es wurden Untersuchungen an zwei großen Problemkreisen aufgenommen, die einmal die respiratorische Funktion betreffen (Messung von Sauerstoffbindungskurven), zum anderen die molekulare Organisation von Spinnenhämocyaninen. Hierzu wurde das Dissoziations-Assoziations-Verhalten der beiden Spinnenhämocyanine in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht; außerdem wurden Elektrophoresen durchgeführt und elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Chemikalien:

Alle Reagenzien waren nach Möglichkeit von p. A. Qualität. Acrylamid und Bismethylenacrylamid wurden von der Firma Th. Schuchardt (AC 098 bzw. ME 178) bezogen. Die Standardlösung für die Kupferbestimmung wurde aus Merck Titrisol Nr. 9936/0001 hergestellt. Für die Messung der Sauerstoffbindungskurven wurden nachgereinigter Stickstoff und Höhenatem-Sauerstoff der Firma Linde verwendet.

Tiere und Tierhaltung:

Dugesiella californica ist die verbreitetste Vogelspinnenart im Süden und Südwesten der USA. Sie wurde nach den Bestimmungstabellen von COMSTOCK (1965) bestimmt; allerdings sind die Bestimmungsmerkmale nicht eindeutig, so daß auch die Art Dugesiella hentzi nicht ganz ausgeschlossen ist. Die Art hat eine Körperlänge von rund 6 cm und ein Körpergewicht von 13-15 Gramm. Die Tiere werden in der Dämmerung aktiv; sie verkriechen sich tagsüber unter Steinen, in Baumlöchern u. ä.. Exemplare von Dugesiella wurden von "College Biological Supply Inc.", Seattle, bezogen. Die Tiere wurden in Plastikschüsseln gehalten, deren Boden mit Torfmull bedeckt war; als Verschluß diente Fliegengitter. Der Torfmull wurde stets gut befeuchtet. Als Futter dienten Schaben (Leucophaea maderae, Periplaneta americana) und Grillen (Gryllus bimaculatus). Der Zuchtraum wurde bei konstanter Temperatur von 23 ^{o} gehalten; der Wechsel von Licht und Dunkelheit erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus. Die Tiere

fraßen in Gefangenschaft sehr wenig; einige häuteten sich während acht Monaten noch zweimal. Das Alter der Tiere war nicht bekannt. Sie wurden ungeachtet ihres Geschlechts und Alters für die Versuche verwendet. Die Haltung von Cupiennius salei K., einer aus Mittelamerika stammenden Kammspinnenart, ist schon früher beschrieben worden (MELCHERS, 1963; LOEWE et al., 1970). Bei dieser Art wurde die Hämolymphe durchweg aus adulten Weibchen gewonnen.

Entnahme der Hämolymphe:

Die Hämolymphe wurde im wesentlichen wie früher beschrieben (LOEWE et al., 1970), jedoch nicht mehr aus den Gelenkhäuten, sondern aus dem dorsal liegenden Herzen entnommen. Dieses wurde mit einer Injektionsnadel punktiert, und die hervorquellende Hämolymphe mit einer Pasteurpipette abgesaugt.

Puffer:

Die verwendeten Puffer wurden entsprechend den Vorschriften von LONG (1961) hergestellt. Sie hatten alle die Ionenstärke 0,1; durch Zusatz von $MgCl_2$ (0,01 m) bzw. KCN (0,01 m) erhöhte sich die Ionenstärke geringfügig. Folgende Puffer wurden verwendet: Na/K-Phosphatpuffer (pH 5,8 - 7,8), Tris/HCl-Puffer (pH 7,8 - 9,0) und Bicarbonatpuffer (pH 9,0 - 10,3).

Quantitative Bestimmungen:

An nicht enteiweißter, zellfreier Hämolymphe wurden Absorptionsspektren, pH-Wert und Kupfergehalt gemessen. Andere Proben wurden, wie bereits beschrieben (LOEWE et al., 1970), enteiweißt.

Bestimmung des pH-Werts: Mit einer Halbmikro-Glaselektrode der Firma Pusl, München. Zur Bestimmung wurde zellfreie, ungeronnene Hämolymphe benützt.

Kupfer: Die Bestimmung erfolgte mittels einer kolorimetrischen Methode nach EDEN und GREEN (1940) mit geringfügigen Modifikationen, wie be-

reits beschrieben (LOEWE et al., 1970).

Stickstoff: Die Proben wurden nach LANG (1958) verascht und nach JACOBS (1959) bestimmt. Der Ansatz entspricht den Angaben bei LOEWE et al. (1970).

Proteineichkurven:

Routinemäßig wurde die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktion bei 278 nm bestimmt. Aus den Meßwerten wurde mit Hilfe von Eichkurven die Konzentration abgelesen. Da das Hämocyanin stark hygroskopisch ist, muß man bei der Aufstellung der Eichkurven mit besonderer Sorgfalt vorgehen.

Es wurden jeweils etwa 500 µl Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe mehrere Tage erschöpfend gegen aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden über Phosphorpentoxid im Exsikkator bei ca. 100°C getrocknet. Bei Öffnen des Exsikkators wurde die Zeit gestoppt, und darauf in Minutenabständen die Gewichtszunahme mit einer Mikrowaage bestimmt. Die Abhängigkeit wurde graphisch aufgetragen, und das tatsächliche Gewicht durch Extrapolation nach Null ermittelt. Aus den Einwaagen wurden durch Verdünnung mit geeigneten Pufferlösungen (pH 7,1: Na/K-Phosphatpuffer; pH 9,75: Bicarbonatpuffer) Standardlösungen hergestellt. Dabei blieben sehr geringe unlösliche Anteile zurück. Sie wurden abzentrifugiert, mehrmals mit aqua dest. gewaschen, im Trockenschrank getrocknet und gewogen. Der Betrag wurde von der Einwaage subtrahiert. So gewonnene Eichkurven sind in Abbildung 3 (S. 17) dargestellt.

Messung von Sauerstoffbindungskurven:

Probenvorbereitung: Zur Messung von Sauerstoffbindungskurven wurden je 50 µl Dugesiella- und 63 µl Cupiennius-Hämolymphe mit Puffer auf 1 ml verdünnt. Man erreicht so für beide Tiere etwa gleich große Proteinkonzentrationen (ca. 3 mg/ml). Von pH 6,0 bis pH 7,8 wurden Na/K-Phosphatpuffer, bei pH 8,05 Tris/HCl-Puffer verwendet. Die Proben wurden über Nacht gegen einen großen Überschuß (1 L) des Puffers dialysiert. Wenn

nötig, z. B. bei pH 6,0, wurde der feine Proteinniederschlag vor der Messung scharf abzentrifugiert. Für die Messungen wurden nicht mehr als drei Tage alte Proben (Aufbewahrung bei 5°C) herangezogen. Zur Bestimmung des E_{340}^{max} / E_{278} wurden die Proben nochmals 1:10 verdünnt.

Meßanordnung und Meßvorgang: Da eine Sauerstoffelektrode nicht zur Verfügung stand, wurde zur Messung der Sauerstoffbindungskurven eine von den herkömmlichen abweichende Methode entwickelt. Dabei werden die Hämolympheproben mit Stickstoff-Sauerstoff-Gemischen variabler, aber genau berechenbarer Zusammensetzung (bis zu 1 atm O_2) äquilibriert, und die Änderung der Extinktion bei 340 nm gemessen. Zur Herstellung des Gasgemisches werden beide Gase getrennt über zwei Gasdurchflußzähler (Rotameser) geführt und anschließend in einem T-Stück vermischt. Aus dem Gasstrom wird ein kleiner Teil in einem Kapillarschlauch abgezweigt und von einer Schlauchpumpe weitertransportiert, so daß er bei Atmosphärendruck durch die Probe, die sich in einer temperierbaren Küvette (Hellma Nr. 160 QS) befindet, perlt. Nach kurzem Durchströmen wird der Schlauch herausgezogen, die Küvette mit dem eingepaßten Teflonstopfen verschlossen, und die Extinktion gemessen. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis die Extinktion konstant bleibt, d. h., bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Beschreibung und Eichung der Rotamesser: Die benutzten Gasdurchflußzähler der Firma Rota, Oeflingen, waren unterschiedlich dimensioniert; der kleinere hatte eine maximale Durchflußrate von rund 3 l/h, der größere von 54 l/h. Aus den abgelesenen Skalenwerten konnte mit Hilfe von Eichkurven, die nach Angaben des Herstellers zu berechnen waren, der Gasdurchfluß in ml/min errechnet werden. Die Sauerstoffkonzentration ist nach unten durch das Auftreten von Turbulenzen im kleinen Rotamesser begrenzt (bei 70-80 mm der Skala). Die Eichung der Rotamesser sei an einem Rechenbeispiel für den Sauerstoffdurchfluß am kleiner dimensionierten Rotamesser demonstriert:

Meßwerte: Skalenwert 28,5 mm; Temperatur 291 °K; Druck 0,958 atm;

Aus der Normdichte von Sauerstoff (ϱ = 0,001429 g/cm^3) errechnet sich die Dichte unter den Meßbedingungen zu ϱ_{O_2} = 0,001284 g/cm^3. Durch

graphische Interpolation mit Hilfe von Tabellenwerten (Handbook of chemistry and physics, 1969) erhält man die Viskosität η = 0,01987 cP. Gesucht ist die Durchflußrate Q [ml/min], die sich aus der allgemeinen Durchflußformel für den Schwebekörper (LUTZ, 1959a,b) ergibt:

$$Q = ß \times D_s^{2,5} \times \sqrt{\frac{\varrho_s - \varrho_{O_2}}{\varrho_{O_2}}} \; ; \; [ml/min]$$

Hierin ist ß die sogen. Durchflußzahl, die von einem "Öffnungsverhältnis" m und einer abgeleiteten Reynoldschen Zahl R abhängig ist (Einzelheiten bei LUTZ, 1959a,b); m variiert mit dem Zahlenwert und wird auf Eichtabellen des Herstellers abgelesen. R ergibt sich aus:

$$R = D_s^{1,5} \times \frac{1}{\eta} \times \sqrt{\varrho_{O_2} \times (\varrho_s - \varrho_{O_2})} \; ;$$

D_s ist der größte Durchmesser des Schwebekörpers, ϱ_s sein spezifisches Gewicht (beides Konstanten). ß wird nach Ermittlung von m und Berechnung von R aus einer Kalibrierfaktortafel des Herstellers abgelesen. In meinem Beispiel ist ϱ_s = 3,984 g/cm^3, $D_s^{2,5}$ = 3,18 mm^{2,5}, $D_s^{1,5}$ = 2, 00 mm^{1,5}; es ergibt sich ein ß von 0,00084, so daß Q = 2,48 ml/min resultiert. Diese Rechenoperationen sind analog für zahlreiche Eichwerte durchzuführen, und die daraus resultierenden Eichkurven aufzustellen. Zunächst wurden für jede Kombination Gasart/Temperatur/Druck neue Eichkurven aufgestellt. Es zeigte sich jedoch, daß die Eichkurven einander so ähnlich waren, daß für alle weiteren Messungen die Kurven bei 715 mm Hg und 25 °C als Eichkurven verwendet werden konnten.

Berechnung der Sauerstoffkonzentration: Die Berechnung sei wiederum an einem Zahlenbeispiel demonstriert: Durch entsprechende Einstellung der Schwebekörper in beiden Gasdurchflußzählern ist folgendes Gasgemisch erzeugt worden: 875 ml/min N_2 und 11 ml/min O_2. Das Gemisch enthält also 1,24 % O_2. Bei einem Atmosphärendruck von 723 mm Hg entspricht das 8,98 mm Hg. Die wahre Sauerstoffkonzentration wurde jeweils mit dem Bunsenschen Absorptionskoeffizienten und unter Berücksichtigung von Molarität und "Mehrionigkeit" der verwendeten Puffer in µM O_2/l be-

rechnet. Die genaue Berechnung der wahren Sauerstoffkonzentration war erwünscht, um auch bei Verwendung verschiedenartiger Puffer für weit auseinander liegende pH-Werte eine Vergleichsbasis zu erhalten, darüber hinaus, um den Sauerstoff als Reaktionspartner in einer physikochemisch sinnvollen Größe - was der Partialdruck nicht ist! - zu erfassen. Die Bunsenschen Absorptionskoeffizienten wurden aus Tabellenwerten (International critical tables, 1928, S. 272) folgendermaßen abgeschätzt: Gegeben waren die Bunsenschen Absorptionskoeffizienten für H_2O, 1 m und 2 m NaCl-Lösungen bei 10^oC, 15^oC, 20^oC, 25^oC und 30^oC. Zu jeder Temperatur wurden daher die der jeweiligen Molarität entsprechenden Koeffizienten in ein Koordinatensystem eingetragen und mit dem Kurvenlineal verbunden. Man erhält so eine Schar isothermer Kurven. Außerdem wurde bei gegebener Molarität die Änderung der Koeffizienten mit der Temperatur aufgetragen, um für Messungen bei 35^oC die entsprechenden Werte extrapolieren zu können.

Fortsetzung des Zahlenbeispiels: Bei 25^oC und 0,04 m Phosphatpuffer pH 7,3 beträgt der Bunsensche Absorptionskoeffizient 0,0272 l O_2/l. Die tatsächliche Sauerstoffkonzentration ist daher:

$$\frac{8{,}98 \times 0{,}0272}{760 \times 22{,}41} \equiv \underline{14{,}34\ \mu M\ O_2/l}\ ;$$

Berechnung der prozentualen Sättigung: Als Nullwert der Kurve wurde der Extinktionswert bei 340 nm nach Durchströmen mit reinem Stickstoff genommen; der Extinktionswert nach Durchströmen mit reinem Sauerstoff abzüglich des Nullwerts entsprach 100 % Sättigung. Die prozentuale Sättigung x ergibt sich demnach aus der Gleichung:

$$x = \frac{100 \times (E - E_o)}{E_{max} - E_o}\ ;$$

E : Extinktion des Hämocyanins bei gegebener Sauerstoffkonzentration
E_o : " " " " Sauerstoffkonzentration
E_{max} : " " " " maximaler Sauerstoffkonzentration

E_o setzt sich aus dem Ausläufer der Proteinbande bei 278 nm und dem Verlust durch Lichtstreuung zusammen. Bei der vorliegenden Darstellung

wurde davon ausgegangen, daß sich der Streulichtanteil nicht in Abhängigkeit von der Beladung mit Sauerstoff verändert. Um sicher zu sein, daß das Hämocyanin wirklich vollständig desoxygeniert vorlag, wurden nach Durchströmen mit reinem Stickstoff jeweils die Absorptionsspektren gemessen.

Auswertung: Der Auftrag der Kurve erfolgte zunächst in der üblichen numerischen Form, wobei als Abszisse die Sauerstoffkonzentration in $\mu M\ O_2/l$ und als Ordinate die prozentuale Sättigung aufgetragen wurden. Wenn möglich, wurden aus den Einzelkurven Mittelkurven gebildet. Daneben wurden sowohl Einzel- als auch Mittelkurven in logarithmischer Form als sogen. Hill-plots aufgetragen (s.S. 24). Aus den Hill-plots wurden die Steigungen n bei 50 % Sättigung ermittelt. Zur Charakterisierung und Quantifizierung des sogen. Bohreffekts wurden nach WYMAN (1948) die Quotienten $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta pH$ bei 50 % Sättigung bestimmt. Dabei wurde nicht der Sauerstoffpartialdruck in mm Hg, sondern die Sauerstoffkonzentration in $\mu M\ O_2/l$ eingesetzt.

Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge:

Für die Experimente in der analytischen Ultrazentrifuge wurden 35-75 µl-Proben von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe mit 0,5 ml Puffer verdünnt und drei Tage lang bei $5^{\circ}C$ mit mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Die Proteinkonzentrationen betrugen 4-6 mg/ml im pH-Stabilitätsbereich und um 8 mg/ml im stärker alkalischen Bereich. Für die Verdünnungsreihen wurden Proteinkonzentrationen von 2-16 mg/ml hergestellt.

Technische Daten: Die Läufe wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge, Ultragyro, der Firma Escher Wyss, Zürich, durchgeführt. Dieses Modell ist mit einer Photoautomatik von Brown & Boveri und mit Schlierenoptik ausgerüstet. Es wurden die Standardzellen der Firma Beckman mit Kel F-Mittelstücken, 2°-Sektorwinkel und Wedge-Fenstern verwendet. Alle Läufe erfolgten in einer Wasserstoffatmosphäre von 20 mm Hg bei $20^{\circ}C$ und 50 000 Upm. Zur Dokumentation wurde Tri-X Pan von Kodak verwendet. Die Belichtungsdauer betrug 2,4 sec, der Phasenwinkel 12°. Die Auswertung der Filme erfolgte an einem Mikrokomparator, Nikon/Shadowgraph Modell 6C der

Firma Nippon Kogaku, Tokyo, bei zwanzigfacher Vergrößerung.

Auswertung: Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach dem üblichen graphischen Verfahren (ELIAS, 1969) aus der Gleichung:

$$(s_c)_{app} = \frac{2{,}303}{\omega^2} \times \frac{\Delta \lg r}{\Delta t} ;$$

Aus den apparenten Sedimentationskoeffizienten kann durch Multiplikation mit drei Korrekturfaktoren die Sedimentationskonstante $s^c_{20,w}$ berechnet werden:

$$s^c_{20,w} = (s_c)_{app} \times \left[\frac{\eta_p}{\eta_{H_2O}}\right]_\vartheta \times \left[\frac{\eta_\vartheta}{\eta_{20}}\right]_{H_2O} \times \frac{(1-v)_{20,H_2O}}{(1-v)_{\vartheta,p}} ;$$

Auf eine Umrechnung der apparenten Sedimentationskoeffizienten in die Sedimentationskonstanten wurde aus folgenden Gründen verzichtet:

1. Es lagen niemals reine Komponenten vor
2. Es ist wahrscheinlich, daß die gefundenen Koeffizienten der Sedimentationskonstante sehr nahe kommen, da die Läufe bei der Standardtemperatur von 20°C durchgeführt wurden (dadurch wird der zweite Korrekturfaktor gleich 1) und die verwendeten Puffer niedrige Molaritäten (0,04-0,1 m) aufwiesen. Dadurch dürfte der erste Korrekturfaktor praktisch gleich 1 sein; Gleiches gilt für den dritten Korrekturfaktor. Zusätzlich wurden die Sedimentationskoeffizienten auf die Proteinkonzentration Null extrapoliert.

Bestimmung des Flächenanteils der einzelnen Komponenten: Die photographischen Bilder wurden von dem Bildschirm des Komparators abgepaust, durch Basislinien ergänzt, und die entstandenen Flächen mit einem Planimeter ausgewertet. Von jedem Lauf wurden drei Aufnahmen vermessen, und daraus der Mittelwert gebildet. In einem Fall wurden auch von den Negativen Papierabzüge gefertigt, die "Peaks" ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen.

Ergänzende Versuche:

Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichte: Dazu wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert, mit und ohne $MgCl_2$, die Sedimentationskoeffizienten der

auftretenden Komponenten und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfläche bestimmt.

Vergleich Hämocyanin/Apohämocyanin: Eine Probe von Dugesiella-Hämolymphe wurde einen Tag lang gegen Trispuffer pH 8,8 unter Zusatz von 0,01 m KCN dialysiert (jedoch ohne Zusatz von $MgCl_2$, wie bei COHEN und VAN HOLDE, 1964), um das Kupfer zu entfernen. Anschließend wurde zwei Tage mit mehrmaligem Wechsel gegen den gleichen Puffer ohne KCN dialysiert. Eine identische Probe wurde über den gleichen Zeitraum nur gegen Tris pH 8,8 dialysiert. In einem gemeinsamen Lauf wurden beide Proben miteinander verglichen.

Reaggregationsversuche: Eine Probe von Dugesiella-Hämolymphe wurde einen Tag lang gegen Bicarbonatpuffer pH 10,2 dialysiert. Ein Teil wurde sodann für einen Kontrollauf verwendet, und der Rest in drei Teile geteilt: Der erste Teil wurde weiterhin gegen den gleichen Puffer von pH 10,2 dialysiert, der zweite gegen den selben Puffer unter Zusatz von 0,01 m $MgCl_2$, der dritte Teil gegen Phosphatpuffer pH 7,0. Die Dialysendauer betrug nach der Teilung nochmals zwei Tage.

Isoelektrofokussierung:

Für diese Versuche wurden je 200 µl unbehandelte Dugesiella-Hämolymphe eingesetzt. Die Versuche wurden in der 110 ml-Säule der Firma LKB durchgeführt. Zusammensetzung und Konzentrationen der erforderlichen Lösungen entsprechen den Angaben in der Bedienungsanleitung. Die Fokussierung (Anode oben) erfolgte in einem Sucrose-Dichtegradienten mit 2-proz. bzw. 4-proz. Ampholinelösung in einem pH-Bereich von pH 3-10 und von pH 3-6. Die Versuche dauerten bei einer Temperatur von 5°C jeweils drei Tage. Die angelegte Spannung betrug anfangs 300 V und wurde im weiteren Verlauf auf 500 V erhöht. Nach erfolgter Fokussierung wurden mit einem Fraktionssammler Fraktionen von ca. 2 ml aufgefangen. In jeder wurde die Extinktion bei 278 nm (z. T. auch bei 340 nm) und der pH-Wert bestimmt.

Elektrophoresen:

Elektrophorese in Polyacrylamidgel: Für die Elektrophoresen in Polyacryl-

amidgel wurden Hämolympheproben von 1/2 µl bis 2 µl eingesetzt. Die Läufe erfolgten bei 4 mA/Gel und 5°C; sie dauerten 50-60 min. Die Gele waren 4-proz., als Elektroden- und Gelpuffer diente Phosphatpuffer von pH 6,0 (Ionenstärke 0,1). - Zur Disk-Elektrophorese wurde das System 1a nach MAURER (1968) verwendet, mit 4-proz. Trenngel, jedoch ohne Sammelgel (Laufdauer 100 min bei 3 mA/Gel und 5°C). - Zur Disk-Elektrophorese unter Zusatz von SDS wurde das gleiche System verwendet, jedoch in Gegenwart von 0,1 % SDS. Die Läufe wurden bei 5°C, 4-5 mA/Gel während 30-60 min durchgeführt. - Auch bei der SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (1969) wurde 4-proz. Gel verwendet. Es wurden je 10 µl Spinnenhämolymphe inkubiert. Als Eichproteine wurden Aldolase, Albumin, Ovalbumin, Katalase, Trypsin, Chymotrypsinogen und Cytochrom c (bis auf Trypsin alle von Boehringer, Mannheim) eingesetzt.

Anfärbung und Auswertung der Gele: Die Banden wurden mit Amidoschwarz (TOMBS in MAURER, 1968) oder mit Coomassie Brilliant Blue (WEBER und OSBORN,1969) angefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe einer von der Werkstatt des Instituts gebauten Apparatur densitometrisch ausgewertet. Diese Apparatur wird anstelle des Küvettenschlittens vor den Lichtspalt eines Eppendorf-Photometers gesetzt. Die Gele werden zwischen zwei Objektträgern in einem Metallrahmen fixiert und etwas breitgequetscht. Der Metallrahmen wird auf einen Schlitten festgeklemmt, welcher von einem Elektromotor mit konstanter Geschwindigkeit am Lichtspalt vorbeibewegt wird. Die Extinktion bei 546 nm wird von einem log-Schreiber aufgezeichnet, und die Kurven planimetrisch ausgewertet.

Elektronenmikroskopie:

Für die Elektronenmikroskopie wurden 0,1-proz. Proteinlösungen aus Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe hergestellt und drei Tage lang gegen die entsprechenden Puffer bei 5°C dialysiert. Die Proben wurden auf Kupfernetze mit 60-70 Å starken Kohlefilmen aufgezogen und nach BRENNER und HORNE (1959) negativ kontrastiert. Dazu diente 2-proz. Phosphorwolframsäure, die mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt wurde. Die Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Emiskop 10 bei 59 600 -, 75 000 - und 110 000 - facher Primärvergrößerung gemacht. Film: Agfa Scientia 23 D 56; Entwick-

ler: Agfa G 150, 1:6 verdünnt, 5 min, Raumtemperatur.

DISKUSSION DER METHODEN

Hämolymphentnahme: Bei dem hier angewendeten Verfahren wird durch Arbeiten bei niedriger Temperatur und schnelles Abzentrifugieren der Zellen die Gerinnung verhindert. Bei dem zellfreien Überstand handelt es sich also um Plasma. Dies hat sicherlich Konsequenzen hinsichtlich des pH-Wertes, der über dem pH liegt, den STEWART und MARTIN (1970) angeben, die ihn aus dem Serum bestimmten. Möglicherweise bewirkt aber die Tatsache, daß alle Untersuchungen mit Plasma gemacht wurden, eine weitere Komplikation. FULLER und DOOLITTLE (1971) fanden nämlich im Citratblut, also in ungeronnener Hämolymphe, von Panulirus interruptus ein Fibrinogen im zellfreien Überstand. Dieses Fibrinogen zeichnet sich durch sein hohes Molekulargewicht aus, so daß eine Verwechslung mit einer bestimmten Hämocyaninkomponente nicht ausgeschlossen ist.

Sauerstoffbindungskurven: Zur Messung von Sauerstoffbindungskurven wurden bisher vor allem zwei Methoden benutzt:

1. Die von REDMOND (1955) und vielen älteren Autoren angewandte Methode, bei der die Probe von Atmosphärendruck beginnend schrittweise evakuiert wird.
2. Die Tonometermethode: Bei dieser Methode werden die Proben erst desoxygeniert, und dann schrittweise genau berechnete Volumina Luft bzw. Sauerstoff zugegeben. Die Sauerstoffkonzentration kann entweder berechnet (SPOEK et al., 1964) oder mit einer Sauerstoffelektrode in der Gasphase (JOHNSTON et al., 1967) gemessen werden.

Bei der ersten Methode können über den Atmosphärendruck hinaus keine Sauerstoffpartialdrucke erzeugt werden; daher muß man auf maximalen Sauerstoffdruck extrapolieren. Die hier angewendete Methode hat den Vorteil, daß man Gasgemische bis zu 100 % Sauerstoff herstellen kann. Dieser Vorteil zeigt sich besonders bei solchen Bedingungen, unter denen bei Atmosphärendruck noch keine Sättigung erreicht wird. Als weiterer Vorteil, auch gegenüber der Tonometermethode, wäre zu nennen, daß

man mit geringen Probenmengen auskommt (50 µl Hämolymphe, die auf 1 ml verdünnt werden). Kritisch bemerkbar macht sich die Neigung des Proteins, beim Durchströmen allmählich zu denaturieren, obwohl starkes Schäumen vermieden wird. Vor allem die Nullpunktsbestimmung ist kritisch. Läßt man nämlich den Stickstoff zu langsam durchperlen, so wird, wie das Spektrum zeigt, keine vollständige Desoxygenierung erreicht. Läßt man dagegen den Stickstoff zu stark durchströmen, so kann das Protein schnell denaturieren. Kritisch ist weiterhin die Genauigkeit der Rotamesser, die vor allem im unteren Skalenbereich, offensichtlich durch das Auftreten von Turbulenzen, keinen konstanten Gasdurchfluß mehr gewährleisten. Deshalb war es in den vorliegenden Versuchen nicht möglich, unter einer Sauerstoffkonzentration von etwa 10 µM O_2/l zu messen. Auch in optimalen Skalenbereichen bleibt die Position der Schwebekörper nie absolut konstant. Diese gerätebedingten Fehler machen sich vor allem bei hoher Affinität des Hämocyanins bemerkbar, wenn bereits geringfügige Unterschiede im unteren Bereich der Sauerstoffkonzentration sehr große Unterschiede im Sättigungsgrad bewirken.

SDS-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung: In Gegenwart des anionischen Detergens SDS ist die elektrophoretische Beweglichkeit aller bisher untersuchten Proteine allein eine Funktion ihres Molekulargewichts (SHAPIRO et al., 1967, WEBER und OSBORN, 1969, REYNOLDS und TANFORD, 1970). Nach REYNOLDS und TANFORD (1970) induziert SDS bei Proteinen eine Konformationsänderung, so daß diese im SDS-Komplex als "rodlike particle" in uniformer Struktur vorliegen. Die Länge dieser Partikel hängt vom Molekulargewicht ab.

Bei der Gelelektrophorese in Polyacrylamidgel werden in Gegenwart von ß-Mercaptoäthanol und SDS zahlreiche hochmolekulare Proteine in ihre Polypeptidketten bzw. Untereinheiten zerlegt. Die Molekulargewichte der Hämolymphe-proteine lagen aber immer über denen der Eichproteine. Daher mußte für sämtliche Komponenten der Spinnenhämolymphe extrapoliert werden. Dies führt bei den höhermolekularen Komponenten sicherlich zu großen Fehlern, da in diesem Bereich (bis zu 600 000) keine Linearität zwischen elektrophoretischer Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichts mehr zu erwarten ist.

E R G E B N I S S E

1. Einige grundlegende Eigenschaften der Hämolymphe

Das Absorptionsspektrum der Hämolymphe zeigt bei beiden Arten den für Hämocyanine typischen Verlauf: Man findet Maxima bei 278 nm, 340 nm und 560 nm. Diese verhalten sich bei Dugesiella wie 142:29:1 und bei Cupiennius wie 171:34:1 (Abbildungen 1 und 2). Das Maximum bei 278 nm geht auf die Proteinnatur des Hämocyanins zurück. Für die Maxima bei 340 nm und 560 nm ist der oxygenierte Kupferkomplex verantwortlich; sie verschwinden, wenn man das Hämocyanin desoxygeniert.

Der pH-Wert der Hämolymphe von Dugesiella wurde in vitro an drei Proben gemessen. Dabei ergab sich ein mittlerer pH-Wert von 7,9 (Einzelwerte: 7,8; 7,85 und 7,95). Er liegt damit über den Werten, die STEWART und MARTIN (1970) angeben (7,25 - 7,35). Da STEWART und MARTIN den pH-Wert an geronnener Hämolymphe bestimmten, dürfte dieser Wert kaum den Verhältnissen in vivo entsprechen. Der hier in ungeronnener Hämolymphe gemessene Wert entspricht dem von pH 8,1, der bei Cupiennius in vivo gemessen wurde (LOEWE et al., 1970).

Der Kupfergehalt der Hämolymphe von Dugesiella liegt mit 120 $\pm$ 10,8 µg/ml (n=7) doppelt so hoch wie bei Cupiennius (57,7 µg/ml; LOEWE et al., 1970). Der Proteingehalt, berechnet aus dem Stickstoffgehalt des TCE-Niederschlags durch Multiplikation mit 6,25, liegt bei Dugesiella mit 65,8 $\pm$ 11,6 mg/ml (n=7) ebenfalls wesentlich höher als bei Cupiennius (48 mg/ml). Der prozentuale Kupferanteil im Gesamtprotein beträgt 0,18 % gegenüber 0,12 % bei Cupiennius und ist den Werten vergleichbar, die PROSSER und BROWN (1961) für gereinigte Hämocyanine anderer Arthropoden aufführen (Palinurus vulgaris, 0,148 %; Limulus polyphemus, 0,173 %; Homarus vulgaris, 0,178 %). Der hohe Kupfergehalt der Spinnenhämolymphe weist darauf hin, daß außer Hämocyanin kaum andere Proteine in der Hämolymphe vorkommen dürften.

Die Proteineichkurven sind in Abbildung 3 wiedergegeben. Für Dugesiella ergibt sich $E_{278}^{1\,\%} = 11$ bei pH 7,1 und $E_{278}^{1\,\%} = 12{,}0$ bei pH 9,75. Die entsprechenden Werte für Cupiennius sind $E_{278}^{1\,\%} = 10{,}6$ bei pH 7,1 und

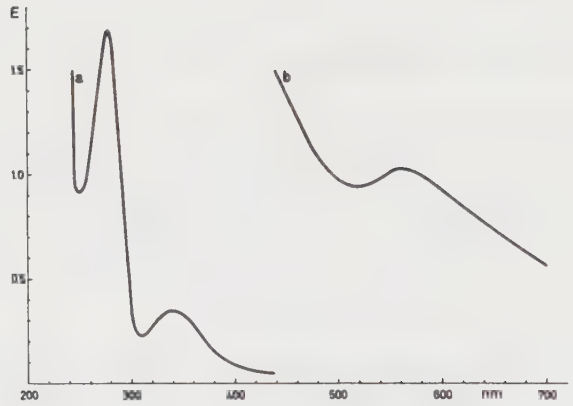

Abbildung 1. Absorptionsspektrum der Hämolymphe von Dugesiella, gemessen bei Raumtemperatur; Verdünnung mit aqua dest.. a) Verdünnung 1:80, b) unverdünnte Hämolymphe.

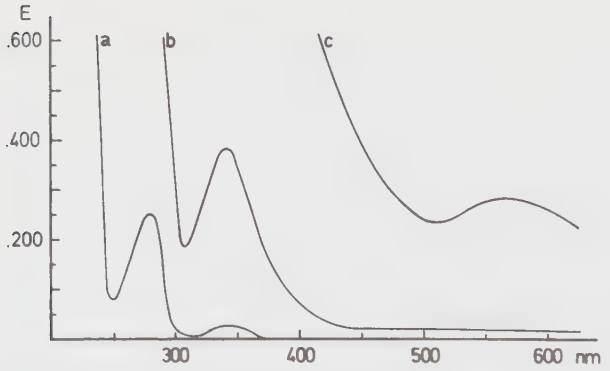

Abbildung 2. Absorptionsspektrum der Hämolymphe von Cupiennius, gemessen bei Raumtemperatur; Verdünnung mit aqua dest.. a) Verdünnung 1:200, b) Verdünnung 1:25, c) unverdünnte Hämolymphe.

$E^{1\,\%}_{278}$ = 11,7 bei pH 9,75. Legt man ein Molekulargewicht von 85 000 Dalton zugrunde, so ergeben sich bei Dugesiella folgende molaren Extinktionen: pH 7,1, ε = 93 500 cm^2/mM; pH 9,75, ε = 102 000 cm^2/mM; die entsprechenden Werte für Cupiennius betragen 90 000 cm^2/mM und 99 400 cm^2/mM. MORIMOTO und KEGELES (1971) fanden bei Hämocyanin von Homarus americanus ein $E^{1\,\%}_{278}$ = 13,4 (pH 9,6) und VAN HOLDE und COHEN (1965) bei dem von Loligo pealei ein $E^{1\,\%}_{278}$ = 15,8 (pH 6,6). Diese Werte liegen über denen für Dugesiella und Cupiennius, jedoch kommt der Wert für Hämocyanin von Homarus americanus den hier gefundenen Werten am nächsten.

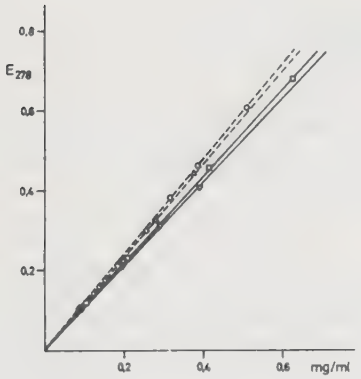

Abbildung 3. Proteineichkurven aus Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe. Die Abszisse gibt die Proteinkonzentration in mg/ml, die Ordinate die Extinktion bei 278 nm an. -□— Dugesiella, pH 7,1; -▽— Cupiennius, pH 7,1; -○- - Dugesiella, pH 9,75; -△- - Cupiennius, pH 9,75.

2. Die Sauerstoffbindungskurven

Die Abbildungen 4 und 5 geben charakteristische Sauerstoffbindungskurven für die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius wieder. Die Abszisse gibt die Sauerstoffkonzentration in μM O_2/l an. Den Sauerstoffpartialdruck in mm Hg erhält man, wenn man die angegebenen Werte durch den Faktor 1,45 (Trispuffer pH 8,05) bzw. 1,6 (Phosphatpuffer pH 7,0) dividiert. Die Ordinate gibt die Sättigung des Hämocyanins in Prozenten an. Die Sauerstoffbindungskurve von Dugesiella zeigt bei 15°C und annähernd physiologischem pH (pH 8,05) einen hyperbolischen Verlauf. Die Sauerstoffbindungskurve von Dugesiella bei 25°C und pH 6,9 verläuft sigmoid, eben-

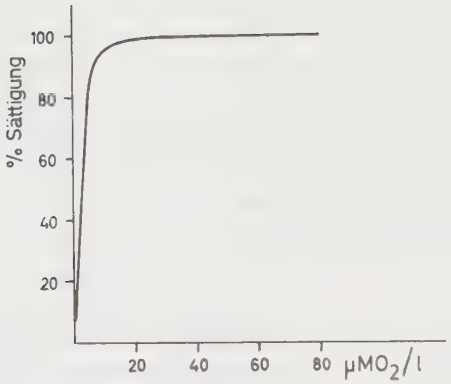

Abbildung 4. Sauerstoffbindungskurve des Hämocyanins aus Dugesiella bei 15°C und pH 8,05 (Mittelkurve, gebildet aus 5 Einzelkurven).

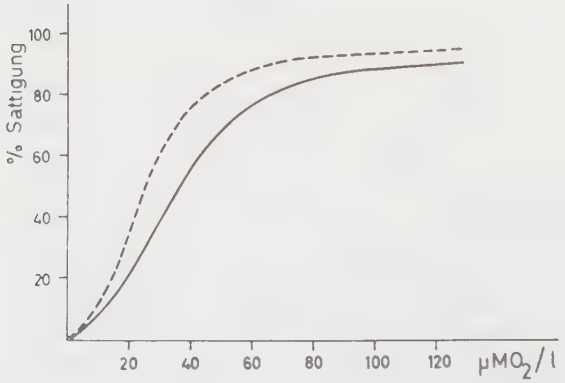

Abbildung 5. Sauerstoffbindungskurve des Hämocyanins aus Dugesiella (durchgezogene Kurve) bei 25°C und pH 6,9 (Mittelkurve aus 3 Einzelkurven) und Sauerstoffbindungskurve des Hämocyanins aus Cupiennius (gestrichelte Kurve) bei 25°C und pH 7,0 (Mittelkurve aus 3 Einzelkurven).

so die von Cupiennius bei gleicher Temperatur und pH 7,0.

a) Abhängigkeit von der Temperatur

Die Affinität des Hämocyanins gegenüber Sauerstoff, gemessen an der Halbsättigungskonzentration $[O_2]_{50}$, sinkt mit steigender Temperatur. Bei Dugesiella wurde die Temperaturabhängigkeit bei drei pH-Werten in einem Bereich von 15°C bis 35°C gemessen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Änderung der Halbsättigungskonzentration $[O_2]_{50}$ (in μM O_2/l) des Hämocyanins von Dugesiella mit der Temperatur bei drei pH-Werten

t °C	pH 6,05	7,30	8,05
15	15,0	18,5	3,0
20	----	23,5	5,8
25	22,0	32,0	7,9
30	----	38,0	15,6
35	38,0	42,0	24,0

b) Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität vom pH-Wert nennt man Bohreffekt: Eine Affinitätszunahme mit steigendem pH bezeichnet man als positiven, eine Affinitätsabnahme entsprechend als negativen Bohreffekt. Das Ausmaß des Bohreffekts wird nach WYMAN (1948) durch den Quotienten $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH quantifiziert. Dieser Quotient gibt die Steigung der Kurve in einem bestimmten pH-Intervall an; ein negatives Vorzeichen kennzeichnet den positiven, ein positives Vorzeichen den negativen Bohreffekt. Die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen die Veränderung der Affinität mit dem pH, die Tabelle 2 stellt die Änderung des Quotienten $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH dar für die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius bei 25°C. Die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius verhalten sich im Prinzip gleichartig: Das Hämocyanin von Dugesiella zeigt zwischen pH 6,05 und pH 6,60 einen negativen Bohreffekt; zwischen pH 6,6 und pH 8,05 tritt ein positiver Bohreffekt auf, der zunächst langsam, im physiologischen pH-Bereich jedoch, um pH 7,9, stark zunimmt. Cupiennius-Hämocyanin zeigt zwischen

pH 6,0 und pH 6,4 einen vergleichsweise schwachen negativen Bohreffekt; der positive Bohreffekt zwischen pH 6,4 und pH 7,8 bleibt nahezu gleich groß - über den Anfangswerten von Dugesiella liegend; im physiologischen pH-Bereich nimmt er geringfügig zu.

Tabelle 2. Änderung des Quotienten $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH in verschiedenen pH-Bereichen bei Hämocyanin aus Dugesiella und Cupiennius; Temperatur 25°C. Den steilsten Abfall der Halbsättigungskonzentration findet man im physiologischen pH-Bereich.

Dugesiella		Cupiennius	
pH-Bereich	$\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH	pH-Bereich	$\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH
6,05-6,60	+ 0,473	6,00-6,60	+ 0,078
6,60-6,90	- 0,113	6,60-7,00	- 0,328
6,90-7,30	- 0,148	7,00-7,40	- 0,350
7,30-8,05	- 0,809	7,40-7,80	- 0,423

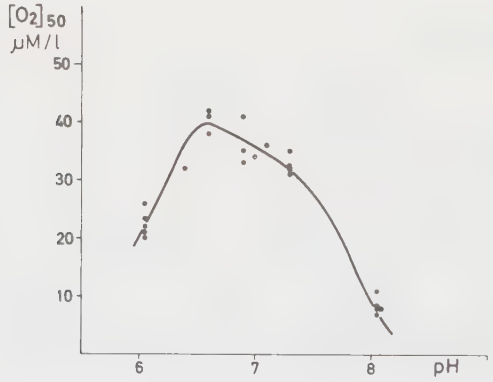

Abbildung 6. Änderung der Halbsättigungskonzentration mit dem pH-Wert bei Hämocyanin von Dugesiella; Temperatur 25°C. Die Ordinate gibt die Halbsättigungskonzentration in µM O_2/l an.

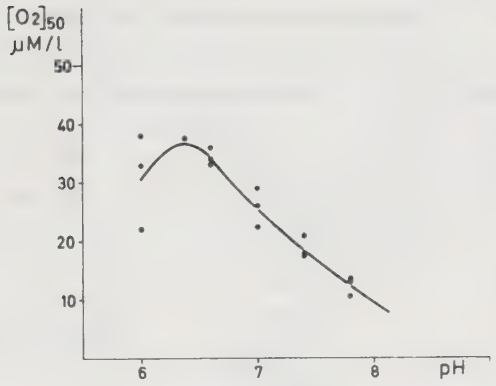

Abbildung 7. Änderung der Halbsättigungskonzentration mit dem pH-Wert bei Hämocyanin von Cupiennius; Temperatur 25°C. Die Ordinate gibt die Halbsättigungskonzentration in µM O_2/l an.

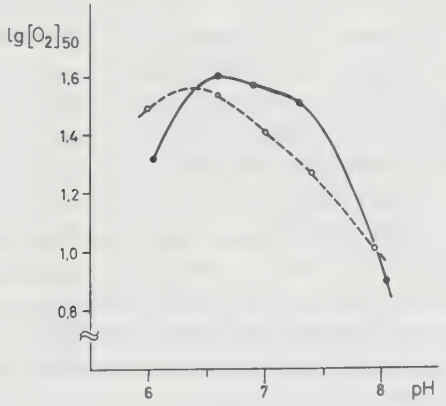

Abbildung 8. Änderung des Logarithmus der Halbsättigungskonzentration ($lg\left[O_2\right]_{50}$) mit dem pH-Wert bei Dugesiella (durchgezogene Kurve) und Cupiennius (gestrichelte Kurve); Temperatur 25°C (die eingezeichneten Werte sind aus 3-5 Einzelwerten gemittelt).

Das Ausmaß des Bohreffekts ändert sich mit der Temperatur. Dies zeigt Tabelle 3 am Beispiel von Dugesiella: Der Bohreffekt ist bei 15°C am stärksten ausgeprägt und sinkt mit steigender Temperatur.

Tabelle 3. Änderung des $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH bei Hämocyanin von Dugesiella; pH-Bereich 7,35-8,05.

t °C	$\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta$ pH
15	- 1,050
20	- 0,791
25	- 0,805
30	- 0,520
35	- 0,324

c) Der Quotient E^{max}_{340} / E_{278}

Mißt man in einer Hämocyaninlösung nach Beladen mit reinem Sauerstoff das Verhältnis der Extinktionen bei 340 nm ("Kupferbande") und 278 nm ("Protein-Bande"), so gewinnt man ein Maß für die "spezifische Beladung" des Hämocyanins (alternative Interpretation s. u.). In der vorliegenden Literatur wird erstmalig in der Arbeit von DE PHILLIPS et al. (1969) ein Hinweis darauf gegeben, daß dieser Quotient pH-abhängig ist. Auch bei den Spinnenhämocyaninen ist er vom pH-Wert und von der Temperatur abhängig. Tabelle 4 zeigt die Änderung des Quotienten mit der Temperatur für das Hämocyanin von Dugesiella, Abbildung 9 seine Abhängigkeit vom pH-Wert bei gleichbleibender Temperatur: Im untersuchten Bereich von pH 6 bis pH 8 sinkt der Quotient stark ab. Dies ist insofern interessant, als im gleichen Bereich die Affinität des Hämocyanins zum Sauerstoff insgesamt erheblich zunimmt (vergleiche Abbildung 8 mit Abbildung 9). Bei Dugesiella ergibt sich um pH 6,6 ein Maximum, das allerdings nur durch einen Meßpunkt gestützt wird.

Die Änderung des Quotienten mit dem pH-Wert könnte prinzipiell mehrere Ursachen haben:

1. Die Extinktion bei 278 nm ändert sich mit dem pH-Wert
2. Die Extinktion bei 340 nm ändert sich mit dem pH-Wert

3. Die "spezifische Beladung" = Kapazität des Hämocyanins hängt tatsächlich von der H^+-Konzentration ab

Während die Änderung der Extinktion bei 278 nm als Ursache ausscheidet, (Abbildung 10), kann gegenwärtig noch nicht entschieden werden, welche der anderen beiden Möglichkeiten für die Änderung des Quotienten verantwortlich ist. Dazu müßte man die Quotienten in Abhängigkeit vom pH-Wert messen, und gleichzeitig Gasanalysen durchführen, die über die absolute Beladung des Hämocyanins Auskunft geben.

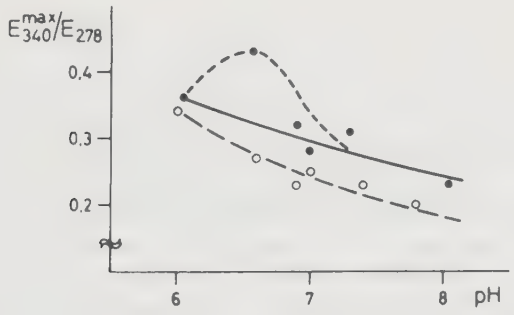

Abbildung 9. Die Änderung des Quotienten E_{340}^{max} / E_{278} mit dem pH-Wert bei Hämocyanin von Dugesiella (durchgezogene Kurve) und Cupiennius (gestrichelte Kurve) bei 25°C; mit einer Ausnahme (Dugesiella, pH 6,05, Mittelwert aus 5 Einzelmessungen) stammen alle Werte aus Einzelmessungen.

Tabelle 4. Die Änderung des Quotienten E_{340}^{max} / E_{278} mit der Temperatur bei Hämocyanin aus Dugesiella

t °C pH	6,05	7,30	8,05
15	0,367	0,328	0,253
25	0,346	0,309	0,232
35	0,328	0,305	0,230

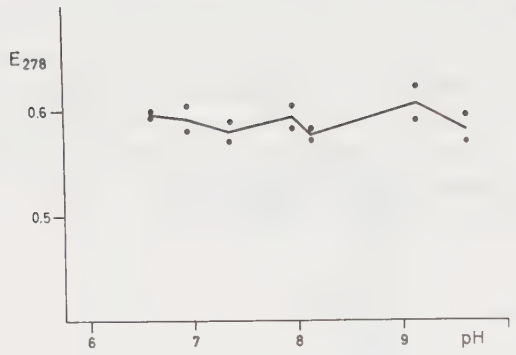

Abbildung 10. Änderung der Extinktion bei 278 nm mit dem pH-Wert von Hämocyanin aus Cupiennius (10 µl Hämolymphe + 1 ml Puffer)

d) Der Hill-Parameter n als Maß für die Kooperativität

Die Sauerstoffbindungskurven der Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius verlaufen unter bestimmten Bedingungen sigmoid, ebenso wie die anderer Hämocyanine. Dies zeigt, daß eine positive Wechselwirkung (Kooperation) zwischen den Untereinheiten besteht. Um ein Maß für die Kooperativität zu gewinnen, wurden alle Sauerstoffbindungskurven in Form sogen. Hill-plots aufgetragen, entsprechend der Gleichung: $\lg x / (1-x) = \lg K + n \lg(O_2)$ (HILL, 1910). Dabei ist x der Anteil des oxygenierten Hämocyanins, (1-x) der Anteil des sauerstoffreien Hämocyanins, K die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, (O_2) die molare Sauerstoffkonzentration, und n die Steigung der erwarteten Geraden, der sogen. Hill-Parameter. Es ergibt sich im allgemeinen, daß die Abhängigkeit nicht linear ist (d. h., daß die Gleichung streng genommen nicht gültig ist), daß aber ein nahezu linearer Bereich erhalten wird, dessen Steigung n eine Aussage über die Kooperativität und über die Mindestzahl der Untereinheiten ermöglicht (WYMAN, 1964). Tabelle 5 stellt die Abhängigkeit von n (bei Halbsättigung) von der Temperatur bei drei pH-Werten dar, die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Abhängigkeit vom pH-Wert bei 25°C.

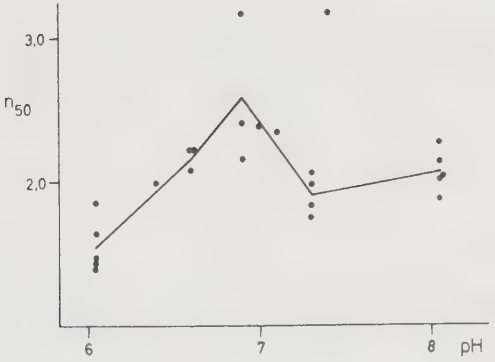

Abbildung 11. Die Abhängigkeit des Hill-Parameters n vom pH-Wert bei Halbsättigung und 25°C des Hämocyanins aus Dugesiella

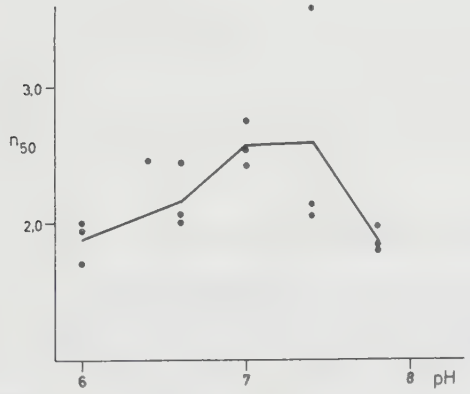

Abbildung 12. Die Abhängigkeit des Hill-Parameters n vom pH-Wert bei Halbsättigung und 25°C des Hämocyanins aus Cupiennius

Tabelle 5. Die Abhängigkeit des Hill-Parameters n von der Temperatur bei Halbsättigung und drei pH-Werten des Hämocyanins aus Dugesiella

$t^{o}C$ pH	6,05	7,30	8,05
15	1,57	1,39	1,90
20	----	1,56	2,00
25	1,59	1,94	2,03
30	----	2,02	3,69
35	1,86	2,02	3,96

Die "mittlere" Kooperativität nimmt also mit steigender Temperatur zu. Diese Zunahme ist bei pH 6,05 relativ gering und bei pH 8,05 am stärksten. Bei Dugesiella steigt n zunächst zwischen pH 6,05 und pH 6,60 synchron mit der Halbsättigungskonzentration an. Während jedoch die Halbsättigungskonzentration ab pH 6,60 bereits wieder sinkt, steigt n noch bis pH 6,9 weiter an, fällt dann stark bis pH 7,3 ab und bleibt bis pH 8,05 etwa auf gleicher Höhe, während die Halbsättigungskonzentration weiter abfällt. Ähnlich verhält sich die Kooperativität auch bei Cupiennius, mit dem Unterschied, daß sich das Maximum noch weiter hinein ins Alkalische verlagert, nach pH 7,4, und daß dann n stark abfällt. Verallgemeinernd läßt sich zunächst feststellen, daß die Kooperativität, gemessen an n bei Halbsättigung in erheblichem Maße vom pH-Wert abhängig ist.

3. Der Aufbau der Hämocyanine aus Untereinheiten

a) Zur Frage der Einheitlichkeit der Hämolympheproteine

Der hohe Kupfergehalt der Spinnenhämolymphe (s. S. 15) deutet bereits darauf hin, daß neben Hämocyanin keine anderen Proteine in nennenswertem Umfang zu erwarten sind. Der Kupfergehalt des gesamten Hämolympheproteins kommt bei Dugesiella dem reiner Hämocyanine sehr nahe; bei Cupiennius ist er allerdings deutlich niedriger (0,12 %). Die Einheitlichkeit der Hämolympheproteine muß genauer geprüft werden, wenn man verdünnte Hämolymphe-proben anstelle von Proben gereinigten Hämocyanins einsetzen will.

Hämolymphe aus Dugesiella wurde zunächst durch Isoelektrofokussierung analysiert, wobei die Proteine hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt werden. Dabei zeigte sich, daß die Hämolymphe nur wenige Komponenten enthält (Abbildung 13): An der alkalischen Grenze des Fraktionierungsbereichs findet man eine schwache Bande, deren Lage im pH-Gradienten vom Fraktionierungsbereich abhängt: Sie liegt bei pH 7,5 bei einem Ampholine-Bereich von pH 3-10 und bei pH 6,3, also schon jenseits der pH-Grenze zum alkalischen Elektrodenpuffer, bei einem Bereich von pH 3-6. Das UV-Spektrum dieser Bande fällt von 230 nm an kontinuierlich ab, ohne Maximum bei 278 nm; demnach handelt es sich sicher nicht um ein Protein.

Neben dieser wurde noch eine, sehr starke Bande gefunden. Sie verändert - im Gegensatz zur ersten - ihre Lage nicht; ihr Gipfel liegt um pH 5. Diese Bande, die offensichtlich das gesamte Protein enthält, konnte durch ihr Absorptionsspektrum (E_{278} = 2,275; E_{340} = 0,720) und durch Sedimentationsanalyse als Hämocyanin identifiziert werden. Im Schlierenbild wurde wegen der hohen Verdünnung nur die hochmolekulare 37 S-Komponente beobachtet.

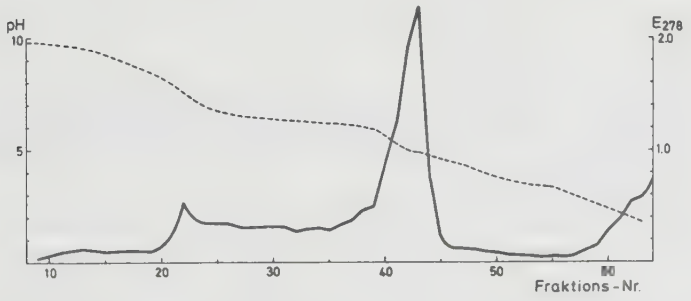

Abbildung 13. Isoelektrofokussierung der Hämolympheproteine aus Dugesiella im pH-Bereich 3-10. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des pH-Gradienten, die durchgezogene Linie den der Extinktion bei 278 nm (als Maß für die Proteinkonzentration).

Bei der Isoelektrofokussierung wurde gleichzeitig der isoelektrische Punkt des Hämocyanins aus Dugesiella ermittelt: Er liegt bei pH 5 (4,95 und 5,05). Dies entspricht dem Wert, den STEDMAN und STEDMAN (1926a) für Hämocyanin von Homarus vulgaris (pH 4,95) und PEDERSEN (zit. von REDFIELD, 1934) für Hämocyanin von Astacus fluviatilis (pH 4,93) angeben. Bedauerlicherweise fällt das Hämocyanin von Dugesiella an seinem isoelektrischen Punkt in Form feinverteilter Flöckchen aus, die langsam nach unten sinken, jedoch später wieder in Lösung gehen. Nicht ausgeschlossen wäre durch diesen Versuch, daß die als Hämocyanin identifizierte Bande noch in geringen Mengen ein Fibrinogen enthält, auf das bereits früher hingewiesen wurde (s. S. 13). Dieses Fibrinogen hat bei Panulirus interruptus ebenfalls einen isoelektrischen Punkt um pH 5. Daher dürfte das Fibrinogen durch Elektrofokussierung kaum von Hämocyanin zu unterscheiden sein.

Die Sedimentationsanalysen von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe im physiologischen pH-Bereich zeigen, daß nur zwei bzw. drei Proteinkomponenten vorhanden sind (s. Abbildungen 25 und 26). Bei Dugesiella findet man eine hochmolekulare 37 S-Komponente, deren Anteil annähernd 90 % beträgt, und eine 16 S-Komponente. Auch die Hämolymphe von Cupiennius besteht im wesentlichen aus zwei hochmolekularen Komponenten (24 S und 16 S), die in annähernd gleicher Menge vorliegen. Daneben findet man noch geringe Mengen einer 5 S-Komponente. Die gefundenen Proteine zeigen ein für Hämocyanine typisches Verhalten: Sie dissoziieren ab eines bestimmten pH-Wertes in Untereinheiten (s. S. 38), mit Ausnahme der 5 S-Komponente, die bereits die kleinste Einheit darstellt. Auf Grund dieses spezifischen Dissoziationsverhaltens und ihres hohen Molekulargewichts müssen diese Komponenten als Hämocyanine angesprochen werden; allein die 16 S-Komponente könnte vielleicht ein Fibrinogen enthalten: Dieses Fibrinogen besitzt bei Panulirus interruptus eine Sedimentationskonstante von 14,5 S, jedoch ist sein Anteil gering (4 mg/ml, FULLER und DOOLITTLE, 1971a).

Bei Elektrophorese der Hämolympheproteine aus Dugesiella und Cupiennius in Polyacrylamidgel findet man jeweils kurz unter dem Start eine quantitativ überwiegende Bande (90 % bzw. 97 % des Gesamtproteins; Abbildung 15,

a und b). Die geringe Distanz zwischen dieser Bande und dem Start weist darauf hin, daß es sich dabei um hochmolekulares Protein handelt, da bei Elektrophorese in Polyacrylamidgel ein starker Molekularsiebeffekt auftritt (MAURER, 1968). Zweifellos ist die erste Bande Hämocyanin, bei Dugesiella wohl die 37 S-Komponente - gekennzeichnet durch kürzere Distanz zum Start -, bei Cupiennius ein Gemisch aus 24 S- und 16 S-Komponente. Ob es sich bei den anderen Banden ebenfalls um Hämocyanin, oder um andere Proteine handelt, ist noch zu klären.

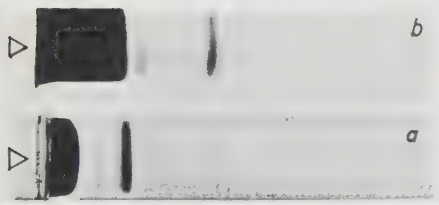

Abbildung 14. Elektrophorese der Hämolympheproteine von a) Dugesiella und b) Cupiennius; 4-proz. Gel, Phosphatpuffer, pH 6,0; 4 mA/Gel, 60 min. Die Pfeilrichtung kennzeichnet den Start.

Disk-Elektrophorese: Das Bandenmuster von Dugesiella-Hämolymphe nach Disk-Elektrophorese unter Zusatz von SDS zeigt, daß die Proteinfraktion einheitlich ist (Abbildung 15). Man findet eine einzige Hauptbande, die nahezu das gesamte Protein auf sich vereinigt (84 %).

Abbildung 15. Disk-Elektrophorese der Hämolympheproteine von Dugesiella unter Zusatz von SDS; 4-proz. Gel, System 1a aus MAURER (1968), 4 mA/Gel, 50 min. Die Pfeilrichtung kennzeichnet den Start.

Bei Cupiennius jedoch ist die Proteinfraktion nicht einheitlich. Disk-Elektrophoresen mit und ohne SDS (Abbildungen 16,17) zeigen immer mehrere Hauptbanden: Beispielsweise findet man bei Disk-Elektrophorese nach MAURER (1968, System 1a) vier Proteinbanden, die z. T. kaum voneinander getrennt sind (Abbildung 16, Banden 1-4). Ihr Anteil am Gesamtprotein beträgt: Bande 1, 27 %; Bande 2, 18 %; Bande 3+4, 50 %. Diese vier Banden ergeben zusammen nahezu die gesamte Proteinmenge (der Rest wird durch die Färbung des Untergrunds bedingt). Sie sind vermutlich durch Dissoziation während

des Laufs entstanden, da der pH-Wert des verwendeten Trenngelpuffers mit pH 8,9 bereits im Dissoziationsbereich des Hämocyanins von Cupiennius liegt (s. S. 40). Diese vier Banden dürften aus der Bande 1 (Abbildung 14b) hervorgegangen sein, die bei einfacher Elektrophorese auftritt; sie werden daher als Hämocyaninkomponenten angesprochen.

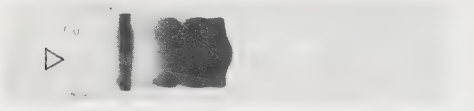

Abbildung 16. Disk-Elektrophorese der Hämolympheproteine von Cupiennius; 4-proz. Gel, System 1a aus MAURER (1968), 3 mA/Gel, 100 min. Die Pfeilrichtung kennzeichnet den Start; die Banden werden vom Start beginnend gezählt.

Setzt man dem diskontinuierlichen System 0,1 % SDS zu, so erhält man sehr differenzierte, variable Bandenmuster. Dafür kann man eine Reihe von Faktoren verantwortlich machen: Technisch bedingte Faktoren (Gel-Eigenschaften, Stromstärke), Dissoziation des Hämocyanins unter dem Einfluß des alkalischen pH-Wertes und des SDS und (weniger wahrscheinlich) Probenvariabilität. Trotzdem schält sich für Cupiennius ein charakteristisches Bandenmuster heraus, das neben zahlreichen haarfeinen Banden fünf intensiv angefärbte Hauptbanden zeigt, die in ihrer Gesamtmenge immer um 90 % des Gesamtproteins ausmachen (Abbildung 17).

Abbildung 17. Disk-Elektrophorese der Hämolympheproteine von Cupiennius unter Zusatz von SDS; 4-proz. Gel, System 1a aus MAURER (1968), 5 mA/Gel, 35 min. Die Pfeilrichtung kennzeichnet den Start.

Während bei Dugesiella alle Argumente dafür sprechen, daß die Proteinfraktion praktisch ausschließlich Hämocyanin enthält (Kupfergehalt, Spektrum, Sauerstoffbindungskurven, Isoelektrofokussierung, Disk-Elektrophoresen, Sedimentationsanalysen und elektronenmikroskopische Bilder), kann man auf Grund der Bilder der Disk-Elektrophoresen nicht annehmen, daß die Proteinfraktion von Cupiennius-Hämolymphe einheitlich ist. An-

dererseits zeigen Kupfergehalt, Spektrum und respiratorische Eigenschaften, daß die Proteinfraktion sicher einen beachtlichen Anteil an Hämocyanin aufweist. Zudem findet man bei den Sedimentationsanalysen, daß die Hämolymphe von Cupiennius nur drei Komponenten enthält, die miteinander in einem für Hämocyanine charakteristischen, pH-abhängigen Gleichgewicht stehen (die Frage ihrer Einheitlichkeit wird unten diskutiert). Es ist daher anzunehmen, daß die Hauptbanden, die man bei der Disk-Elektrophorese findet, Hämocyaninkomponenten sind, die - wie bereits erwähnt - durch Dissoziation während des Laufs entstanden sind.

b) Die kleinste funktionelle Untereinheit

Berechnung aus der Protein/Kupfer-Relation: Das Molekulargewicht der kleinsten O_2-bindenden Untereinheit des Hämocyanins läßt sich bei Kenntnis des prozentualen Kupferanteils am Gesamtprotein aus der Gleichung $M_{min} = 2 \times 63{,}5 \times 100 / \%\ Cu$ unter folgenden Voraussetzungen berechnen:

1. Die Bindung von einem Molekül Sauerstoff erfordert zwei Kupferatome
2. Alles Protein in der Hämolymphe ist Hämocyanin
3. Es gibt keine kupferfreien Untereinheiten

Bei Dugesiella ergibt die Rechnung ein Molgewicht von 70 500 Dalton, bei Cupiennius dagegen eines von 106 000 Dalton. Die Diskrepanz wird später diskutiert werden; sie spricht ebenfalls für die Gegenwart von weiteren "Nicht-Hämocyanin"-Proteinen in der Hämolymphe dieser Art.

Molekulargewichtsbestimmung durch Polyacrylamid-Elektrophorese unter Zusatz von SDS: Nach WEBER und OSBORN (1969) lassen sich die Molekulargewichte von Proteinbanden, die unter Einwirkung von SDS entstehen, durch Elektrophorese in Polyacrylamid mit Hilfe geeigneter Testproteine bestimmen. Da das größte der eingesetzten Testproteine (Albumin) ein Molekulargewicht von 68 000 Dalton hatte, mußte bereits für die kleinste Hämocyaninkomponente extrapoliert werden. Tabelle 6 gibt geschätztes Molekulargewicht und Anteil der Proteinbanden von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe wieder a) nach 2 Stunden Inkubation mit SDS bei 37°C und b) nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C und 24 Stunden bei 5°C.

Die Daten zeigen, daß alle Molekulargewichte über 100 000 Dalton wegen

der Extrapolation kaum zu verwenden sind. Längere Einwirkung von SDS auf die Proteine aus Cupiennius-Hämolymphe bewirkt, daß sich das quantitative Verhältnis der Proteinkomponenten zugunsten der niedermolekularen verlagert. Für die kleinste Komponente von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe findet man ein Molgewicht von jeweils 85 000 Dalton; dieses kommt dem Wert von etwa 71 000 Dalton, der für die kleinste funktionelle Untereinheit von Dugesiella berechnet wurde, nahe. Sicher ist sie identisch mit der 5-6 S-Komponente, die man bei den Sedimentationsanalysen findet. Zum Vergleich: ELLERTON et al. (1970) ermittelten für die 5 S-Komponente von Cancer magister ein Molekulargewicht von 75 000-80 000 Dalton. Dieser Wert stimmt mit dem hier gefundenen gut überein.

Tabelle 6. Molekulargewichtsbestimmung von Hämolympheproteinen aus Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe

a) 2 Std. 37°C			b) 2 Std. 37°C + 24 Std. 5°C	
Molekulargewicht		%	Molekulargewicht	%
1. Dugesiella	86 000	70	85 000	70
	135 000	15	145 000	15
	155 000	15	182 000	15
	440 000	--	400 000	--
	485 000	--	640 000	--
	530 000	--		
2. Cupiennius	86 000	5	84 000	58
	100 000	18	165 000	11
	122 000	23	182 000	11
	135 000	17	265 000	17
	290 000	2	370 000	2
	340 000	32	440 000	--
	430 000	3	570 000	--

c) Das Verhalten des Hämocyanins in der analytischen Ultrazentrifuge

Sedimentationsanalysen in der analytischen Ultrazentrifuge zeigen, daß

die Hämolymphe von Dugesiella innerhalb eines "pH-Stabilitätsbereichs" (s. S. 38) zwei Proteinkomponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 37 S und 16 S enthält. Im stark Alkalischen fehlt die 37 S-Komponente, dagegen tritt eine 6 S-Komponente auf. Die Hämolymphe von Cupiennius zeigt drei Proteinkomponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 24 S, 16 S und 5 S.

Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten von der Proteinkonzentration: Die Höhe des Sedimentationskoeffizienten hängt bei gegebenen Bedingungen von der Proteinkonzentration ab. Bei Auftragung von S gegen die Proteinkonzentration steigt erwartungsgemäß der Sedimentationskoeffizient mit sinkender Proteinkonzentration (Abbildungen 18 und 19). Im allgemeinen sind die Sedimentationskoeffizienten in beträchtlichem Maße konzentrationsabhängig: Beispielsweise liegt bei Globulinen der Sedimentationskoeffizient einer 1-proz. Lösung um 8 % tiefer als bei der Konzentration Null (ELIAS, 1969). Auch bei den Proteinkomponenten der Spinnenhämolymphe

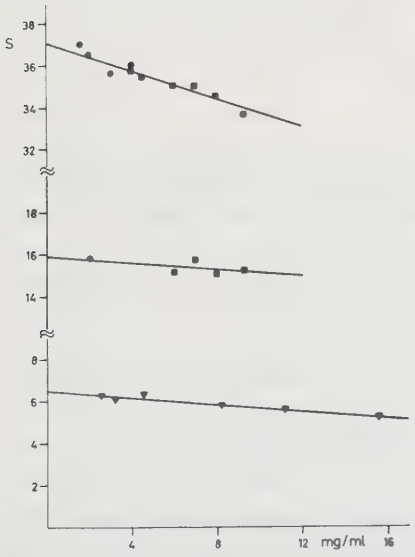

Abbildung 18. Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten aus Dugesiella. Die Abszisse gibt die Gesamtprotein-Konzentration in mg/ml an; Phosphatpuffer pH 7,0 (●); Trispuffer pH 8,4 (■); Bicarbonat pH 9,75 (▼). Die Geraden wurden als Regressionsgeraden berechnet.

liegen die Sedimentationskoeffizienten einer 1-proz. Lösung im Durchschnitt 8 % unter denen bei der Konzentration Null. Durch Extrapolation gegen unendliche Verdünnung ergeben sich für Dugesiella folgende Sedimentationskoeffizienten: 37,1 S, 15,9 S und 6,5 S. Für Cupiennius-Hämocyanin findet man entsprechend 24,3 S, 16,2 S und 5,2 S.

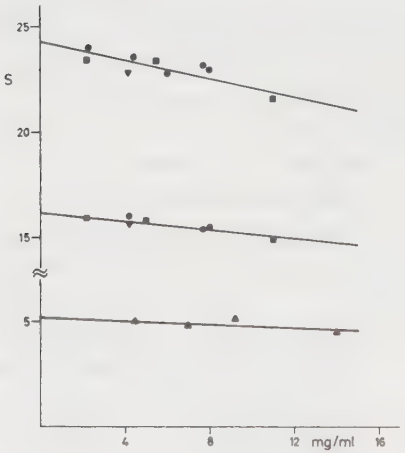

Abbildung 19. Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten aus Cupiennius. Die Abszisse gibt die Gesamtprotein-Konzentration in mg/ml an; Phosphatpuffer pH 6,6 (■); Trispuffer pH 8,1 (●) und pH 8,85 (▼); Bicarbonatpuffer pH 9,75 (▲). Die Geraden wurden als Regressionsgeraden berechnet.

Abhängigkeit der Flächenanteile der Komponenten von der Proteinkonzentration: Zur Abschätzung des Johnston-Ogston-Effektes (JOHNSTON und OGSTON, 1946) wurden die Flächenanteile der einzelnen Komponenten im Schlierenbild gegen die Gesamtprotein-Konzentration aufgetragen (Abbildungen 20-23). Bei pH 8,4, also innerhalb des "Stabilitätsbereichs" ergibt die Extrapolation für Hämocyanin aus Dugesiella folgende Werte: 37 S, 90 % und 16 S, 10 %. Dabei sinkt der Anteil der hochmolekularen Komponente geringfügig ab und der der niedermolekularen steigt entsprechend. Bei pH 9,75, wenn die Dissoziation vollständig erfolgt ist, beträgt der Anteil der 6 S-Komponente, unabhängig von der Proteinkonzentration, 88 % und der der 16 S-Komponente 12 %. Im Falle des Hämocyanins aus Cupiennius ist bei pH 6,6 das Flächenverhältnis der 16 S- und 24 S-Komponenten ebenfalls unabhängig von der Proteinkonzentration; bei unendlicher Verdünnung

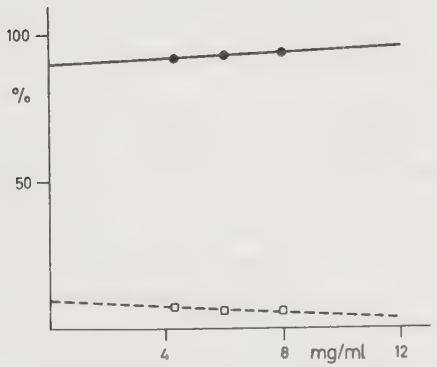

Abbildung 20. Konzentrationsabhängigkeit der Flächenanteile der 37 S- (-●—) und der 16 S-Komponente (-□—) von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 8,4 (Regressionsgeraden). Die Abszisse gibt die Gesamtprotein-Konzentration in mg/ml, die Ordinate den Flächenanteil in % an.

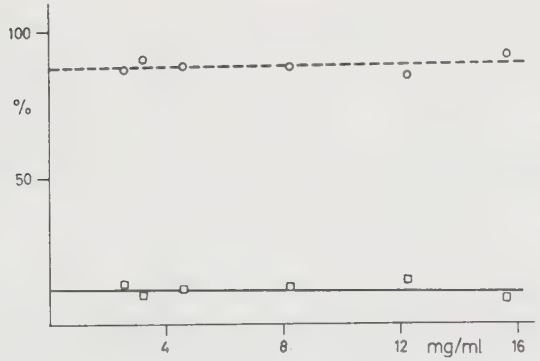

Abbildung 21. Konzentrationsabhängigkeit der Flächenanteile der 16 S- (-□—) und der 6 S-Komponente (-○—) von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 9,75 (Regressionsgeraden); Bezeichnung der Koordinatenachsen wie oben.

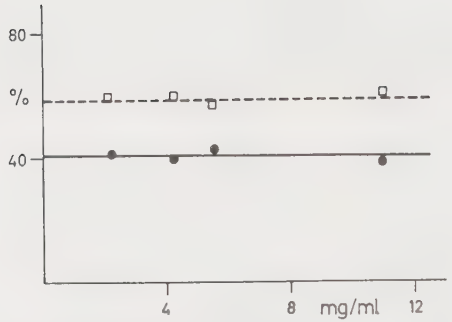

Abbildung 22. Konzentrationsabhängigkeit der Flächenanteile der 24 S- (●——) und der 16 S-Komponente (□--) von Cupiennius-Hämocyanin bei pH 6,6 (Regressionsgeraden); Bezeichnung der Koordinatenachsen wie zuvor.

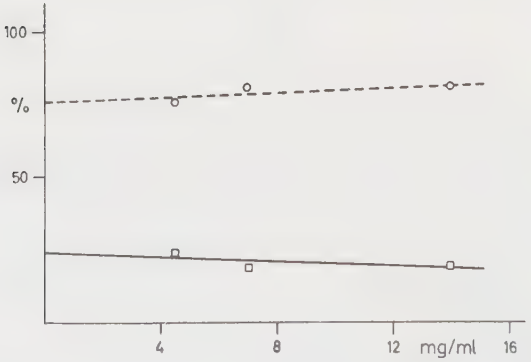

Abbildung 23. Konzentrationsabhängigkeit der Flächenanteile der 16 S- (□——) und der 5 S-Komponente (○--) von Cupiennius-Hämocyanin bei pH 9,75 (Regressionsgeraden); Bezeichnung der Koordinatenachsen wie zuvor.

liegen 59 % als 16 S- und 41 % als 24 S-Komponente vor. Bei pH 9,75 beträgt der Anteil der 5 S-Komponente 76 % und der der 16 S-Komponente 24 %. Eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration läßt sich wegen der geringen Anzahl der Messungen nicht sicher konstatieren; sie ist jedenfalls nicht bedeutend.

Veränderung der Flächenverhältnisse der 16 S- und 37 S-Komponente während eines Laufs: Um eine Vorstellung von dem Zusammenwirken verschiedener Effekte, wie Johnston-Ogston-Effekt und Verdünnungseffekt zu erhalten, wurden bei einer Analyse von Dugesiella-Hämocyanin (pH 6,0) die von den Komponenten und den Basislinien eingeschlossenen Flächen genauestens ausgewertet: Von allen Momentaufnahmen des Laufs wurden vergrößerte Papierabzüge gefertigt, die Flächen sorgfältig ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen. Unter Voraussetzung gleichbleibender Papierdicke zeigte sich dabei folgende Abhängigkeit (Abbildung 24): Vom Anfang bis über die Mitte des Laufes nimmt der Anteil der 37 S-Komponente zu. Diese Zunahme der 37 S-Komponente und gleichzeitige Abnahme der 16 S-Komponente läßt sich aus dem Zusammenwirken von Johnston-Ogston- und Verdünnungseffekt erklären: Der Verdünnungseffekt wirkt sich in der Nähe des Meniskus

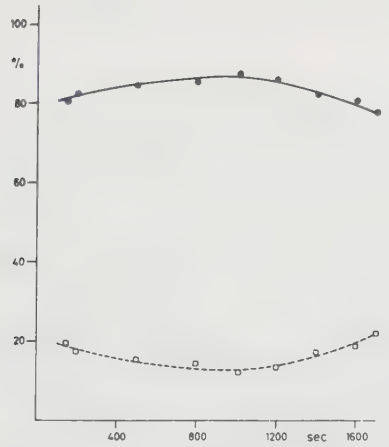

Abbildung 24. Änderung der Flächenverhältnisse der 37 S- (—●—) und der 16 S-Komponente (—□—) von Dugesiella-Hämocyanin während eines Laufs; Phosphatpuffer pH 6,0; Proteinkonzentration 4 mg/ml. Die Abszisse gibt die Laufzeit in sec, die Ordinate den Flächenanteil in % an.

am stärksten aus und klingt mit wachsender Entfernung ab; daher muß der Effekt auch die langsamere Komponente stärker beeinflussen, d. h., die Fläche ihres Schlierengipfels sinkt schneller ab, als bei der schnellen Komponente. Der Johnston-Ogston-Effekt wirkt sich, da er konzentrationsabhängig ist, zu Beginn ebenfalls stärker aus, so daß der Anteil der 16 S-Komponente zunächst auch aus diesem Grund zu hoch ist. Für den weiteren Verlauf, nämlich für das erneute Abnehmen des prozentualen Anteils der schnellen Komponente und das Ansteigen des Anteils der langsamen (nach 1 000 sec) kann allerdings keine Erklärung gegeben werden. Eine Verschiebung infolge einer Neueinstellung des Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichts wurde in Erwägung gezogen; sie wird aber dadurch ausgeschlossen, daß die Basislinie zwischen den beiden Gipfeln nicht erhöht ist.

4. Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichte in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Anwesenheit von Mg^{++}

Die Proteinkomponenten von Dugesiella- und Cupiennius-Hämolymphe stehen miteinander in einem Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht, das u. a. vom pH-Wert und von der Anwesenheit von Mg^{++} beeinflußt wird; sie zeigen damit eine Eigenschaft, die für alle bisher untersuchten Hämocyanine charakteristisch ist.

a) Dugesiella: Die Schlierenbilder von verdünnter Dugesiella-Hämolymphe zeigen - in Abwesenheit von Mg^{++} - innerhalb eines pH-Bereichs von pH 5,8 bis pH 8,85, der im folgenden als "pH-Stabilitätsbereich" bezeichnet werden soll, zwei hochmolekulare Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 37 S und 16 S (Photoseite 1 , Abbildungen 1b und 3b); ihr Anteil an der Gesamtfläche beträgt (ohne Extrapolation auf unendliche Verdünnung) 87 % bzw. 13 %. Das Verhältnis der beiden Komponenten bleibt über den gesamten Stabilitätsbereich gleich (Abbildung 25b). An diesen Stabilitätsbereich schließt sich ein sehr schmaler Bereich zwischen pH 8,9 und pH 9,3 an, innerhalb dessen die Dissoziation über hochmolekulare Zwischenstufen (33 S und 27 S) in die 6 S-Komponente erfolgt (Photoseite 1 , Abbildung 5a,b). Über pH 9,3 liegen 85 % als 6 S- und 15 % weiterhin als 16 S-Kom-

ponente vor (Photoseite 2, Abbildung 7b). Die Anwesenheit von 0,01 m $MgCl_2$ - das ist die zehnfache Menge an Mg^{++}, die RATHMAYER (1965) für die Hämolymphe von Dugesiella angibt - verhindert die Dissoziation der 37 S-Komponente außerhalb des pH-Stabilitätsbereichs (Abbildung 25a; Photoseite 2, Abbildung 7a); man findet über den gesamten untersuchten pH-Bereich hinweg 88 % als 37 S- und 12 % als 16 S-Komponente (Photoseite 1/2, Abbildungen 1a, 3a und 7a).

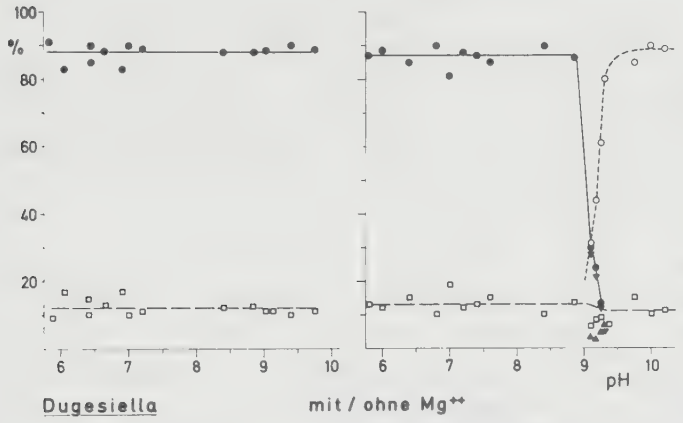

Abbildung 25. Änderung des Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichts der Hämocyaninkomponenten aus Dugesiella mit dem pH-Wert, a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; 37 S- (●), 33 S- (▼), 27 S- (▲), 16 S- (□), 6 S-Komponente (○). Die Ordinate gibt den Flächenanteil der Komponenten in % an.

b) Cupiennius: Das Hämocyanin von Cupiennius zeigt - ohne Zusatz von Mg^{++} - im pH-Bereich von pH 5,8 bis pH 9,05 drei Komponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 24 S, 16 S und 5 S (Abbildung 26b; Photoseite 1, Abbildung 4b). Der Anteil der 24 S-Komponente anfangs, bei pH 5,8 (saurer Dissoziationsbereich), zunächst gering (13 %), er steigt jedoch an bis auf 40 % bei pH 7,0; von da ab bleibt er annähernd gleich bis pH 8,8, um dann - im alkalischen Dissoziationsbereich - innerhalb von 0,05 pH-Ein-

heiten auf Null abzusinken (Photoseite 1,Abbildung 6a,b). Die 16 S-Komponente liegt bei pH 5,8 mit 80 % vor (Photoseite 1, Abbildung 2b), sinkt dann bis auf 58 % bei pH 7,0 und behält diesen Wert bis pH 8,1 bei. Anschließend sinkt sie erst langsam, dann schneller, auf 26 % ab (Photoseite 2, Abbildung 8b). Die 5 S-Komponente ist über einen breiten Bereich, zwischen pH 5,8 und pH 8,3, nur spurenweise vorhanden (ca. 4 %). Ab pH 8,3 steigt ihr Anteil zunächst zögernd (Photoseite 1, Abbildung 4b), zwischen pH 9,0 und 9,2 steil (Photoseite 1, Abbildung 6a,b) bis zu 73 % an (Photoseite 2, Abbildung 8b). Die Anwesenheit von Mg^{++} (Abbildung 26a) erhöht den Anteil der 24 S-Komponente zunächst (bei pH 5,8) von 13 % (bei Mg^{++}-freier Lösung) auf 40 %, bis pH 6,25 auf 50 % (Photoseite 1, Abbildung 2a). Dementsprechend sinkt die 16 S-Komponente auf 50 % ab (gegenüber 58 % bei Mg^{++}-freier Lösung); die 5 S-Komponente wurde nicht beobachtet. Ab pH 8,1 steigt - in weit stärkerem Maße als ohne Mg^{++} - die Konzentration der 24 S-Komponente bis auf 55 % bei

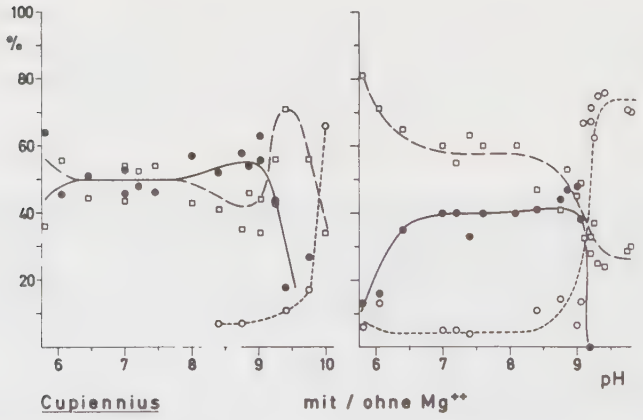

Abbildung 26. Änderung des Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichts der Hämocyaninkomponenten aus Cupiennius mit dem pH-Wert, a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; 24 S- (●), 16 S- (□), 5 S-Komponente (○). Die Ordinate gibt den Flächenanteil der Komponenten in % an.

pH 8,9 an, während der Anteil der 16 S-Komponente auf Werte von 40 % und darunter sinkt. Gleichzeitig tritt etwa ab pH 8,4 erstmalig das kleinste Dissoziationsprodukt, die 5 S-Komponente, auf (Photoseite 1, Abbildung 4a). Ab pH 9,0 steigt der Anteil der 16 S-Komponente, der vorher ein Minimum durchlaufen hatte, noch einmal steil bis auf 71 % an und sinkt dann schnell zugunsten der 5 S-Komponente auf 34 % ab. Die 5 S-Komponente steigt erst langsam, zwischen pH 9,75 und pH 10,0 rasch, auf 66 % an (Photoseite 2, Abbildung 8a).

Wie man sieht, bewirkt die Anwesenheit von Mg^{++} in der Lösung, daß das Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht zugunsten der Assoziationsprodukte verschoben wird. Dabei wird nicht nur die Konzentration der höhermolekularen Komponenten erhöht, sondern auch der pH-Stabilitätsbereich augenfällig erweitert. Der Dissoziationsvorgang erstreckt sich bei den Hämocyaninkomponenten aus Cupiennius auf einen etwas breiteren pH-Bereich als ohne Mg^{++}; er erfolgt offensichtlich stufenweise von der 24 S- zu der sich anhäufenden 16 S-Komponente, die dann ihrerseits wieder in 5 S-Einheiten dissoziiert. Jedoch erscheint der Einfluß von Mg^{++} auf das Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht der Hämocyaninkomponenten von Cupiennius nicht so stark wie bei Dugesiella.

c) Vergleich zwischen Hämocyanin und Apohämocyanin: Auf den Zusammenhalt der Untereinheiten hat offensichtlich auch das Kupfer Einfluß. Seine Wirkung auf das Gleichgewicht der Komponenten wurde an Dugesiella-Hämocyanin bei pH 8,75 untersucht. Bei dem intakten, kupferhaltigen Hämocyanin liegen 88 % als 37 S- und 12 % als 16 S-Komponente vor. Entfernt man jedoch das Kupfer, so liegen nur noch 66 % als 37 S-, 5 % als 16 S- und 29 % als 6 S-Komponente vor (Photoseite 2, Abbildung 9a,b). Es hat also bei einem pH-Wert innerhalb des Stabilitätsbereichs Dissoziation stattgefunden. Damit kommt dem Kupfer neben seiner hervorragenden Rolle in der Sauerstoffbindung eindeutig auch eine stabilisierende Funktion zu.

d) Reaggregationsversuche bei Dugesiella: Um die Reversibilität der Dissoziation zu prüfen, wurde eine Hämolympheprobe aus Dugesiella gegen Puffer von pH 10,2 dialysiert. Die Sedimentationsanalyse ergab 92 % 6 S- und 8 % 16 S-Komponente. Die Probe wurde sodann in drei Teile geteilt; der erste Teil wurde weitere 48 Stunden gegen Puffer pH 10,2 dialysiert, der

zweite gegen Phosphatpuffer von pH 7,0 und der dritte gegen Bicarbonatpuffer von pH 10,2 unter Zusatz von 10 mM Mg^{++} (Photoseite 2, Abbildung 10a,b und 11). Das Ergebnis der Sedimentationsanalysen ist in Tabelle 7 dargestellt:

Tabelle 7. Reaggregationsversuche bei Hämocyanin aus Dugesiella. Mit "Kontrolle" wird die bei pH 10,2 belassene Probe bezeichnet (vergleiche Text).

	Kontrolle	pH 7,0	pH 10,2 + Mg^{++}
S	%	%	%
6	92	--	82
16	8	10	11
28	--	8	--
32	--	32	--
37	--	50	7

Man sieht, daß nach Zugabe von Mg^{++} nur ein kleiner Teil reaggregiert; dagegen zeigt pH-Erniedrigung einen vergleichsweise starken Effekt. Dabei verläuft die Reassoziation interessanterweise über die gleichen Zwischenstufen, wie sie auch bei der Dissoziation gefunden werden (s. S. 38). Unter den gegebenen Bedingungen ist die Dissoziation also in keinem Fall vollständig reversibel.

5. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dugesiella- und Cupiennius-Hämocyanin wurden im "negative staining"-Verfahren aus Proben bei pH 7,5 (Stabilitätsbereich) und bei pH 9,2 (Dissoziationsbereich) angefertigt (Photoseite 3/4, Abbildungen 12-18). Bei Dugesiella erscheint die Hauptkomponente bei pH 7,5 als ein aus vier Monomeren aufgebautes tetrameres Molekül (Abbildung 12), das stets einen breiten Längsspalt aufweist, und dessen Dimensionen etwa 185 x 200 Å betragen. Das Tetramer entspricht der 37 S-Komponente, die man bei den Sedimentationsanalysen findet. Daneben sieht man Dimere, die der 24 S-Komponente entsprechen, und deren Abmessungen etwa 185 x 95 Å betragen. Die Dimere erscheinen als Kombination von zwei

hexagonalen (Abbildung 16, a) oder einem hexagonalen und einem rechteckigen Monomeren (Abbildung 17, a). Der kleinste gut erkennbare Baustein kommt als Hexagon mit etwa 95 Å Durchmesser oder als Rechteck mit rund 82 x 90 Å Seitenlänge vor; er entspricht der 16 S-Komponente[1]. Die Dimensionen der gefundenen Bausteine entsprechen in den Größenordnungen den Werten, die VAN BRUGGEN (in GHIRETTI, 1968) für Avicularia metallica angibt. Das Vorhandensein von Dimeren mit 24 S widerspricht den Sedimentationsanalysen. Möglicherweise entstehen sie durch Dissoziation von Tetrameren unter dem Einfluß des sehr niedermolaren Phosphatpuffers (0,001 m) oder des Färbereagens (VAN BRUGGEN et al., 1963). Bei pH 9,2 dissoziiert Dugesiella-Hämocyanin über hochmolekulare Zwischenstufen vornehmlich in 6 S- und wenige 16 S-Untereinheiten. Im elektronenmikroskopischen Bild sieht man nur die Monomeren (und Dimeren); die 6 S-Komponente erscheint als schwer erkennbares granuläres Material über dem Untergrund (Abbildung 14).

Das elektronenmikroskopische Bild von Cupiennius-Hämolymphe zeigt bei pH 7,5 überwiegend Monomere (16 S), die in hexagonaler bis ringförmiger, quadratischer und rechteckiger Form erscheinen (Abbildung 13, Abbildung 18, b-d). Daneben findet man auch Dimere (24 S), die vorwiegend als Kombination von hexagonalen und rechteckigen Monomeren auftreten (Abbildung 13 und 18, a). Im Widerspruch zu den Sedimentationsanalysen findet man auch Tetramere, deren Dimensionen dem Tetramer von Dugesiella entsprechen. Auch die Abmessungen der Dimeren und Monomeren kommen den entsprechenden bei Dugesiella-Hämocyanin gleich. Die quadratischen Monomeren, die man nur bei Cupiennius findet, haben eine Seitenlänge von 85 Å. Im Dissoziationsbereich, bei pH 9,2, findet man ebenfalls zahlreiche Monomere und Dimere, selten Tetramere; das vollständig dissoziierte 5 S-Hämocyanin erscheint als feingranuliertes Material auf dem Untergrund (Abbildung 15). Die Granula sehen bei Cupiennius- wie bei Dugesiella-Hämocyanin annähernd kugel- (Durchmesser 20 Å) bis stäbchenförmig aus (ca. 35 Å lang und 20 Å breit).

---

1 Diese Zuordnung der Sedimentationskoeffizienten zu den elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen ist heute generell anerkannt. In jüngster Zeit bestätigte sich dies erneut auf einem Hämocyanin-Symposium der EMBO.

Die monomeren Bausteine der Spinnenhämocyanine lassen eine gewisse, schwierig zu interpretierende Substruktur erkennen. Artefakte, wie Beugungserscheinungen sind nicht auszuschließen; zudem erlaubt das elektronenmikroskopische Bild nur eine zweidimensionale Betrachtungsweise. Bei den Monomeren von Dugesiella-Hämocyanin ist die Feinstruktur der hexagonalen Form deutlicher zu erkennen als bei den entsprechenden Monomeren von Cupiennius-Hämocyanin; dabei besetzen offenbar sechs Strukturelemente die Ecken eines Hexagons, in der Mitte sitzt vielleicht ein zentraler Partikel (Abbildungen 16, a; 17, a). Außerdem findet man bei Präparationen von Cupiennius-Hämocyanin ringförmige Moleküle und solche, die eine quadratische Struktur mit vier Strukturelementen erkennen lassen (Abbildung 13, 18,c). Darüber hinaus gibt es bei beiden Spezies eine rechteckige monomere Form mit parallel angeordneten länglichen Elementen; möglicherweise ist dies die Seitenansicht der quadratischen oder der hexagonalen Form (Abbildung 17, a; Abbildung 18, a und d). Bei manchen der Moleküle könnte es sich auch um Fibrinogen handeln, das - soweit elektronenmikroskopische Bilder von Fibrinogenpräparationen aus Panulirus interruptus erkennen lassen (FULLER und DOOLITTLE, 1971b) - einen ähnlichen Habitus zeigt.

D I S K U S S I O N

1. Respiratorische Eigenschaften

Die in vitro, in verdünnter Hämolymphe gemessenen Größen, entsprechen sicher nicht denen, die man in unverdünnter, unbehandelter Hämolymphe messen würde, da dort zusätzliche Effektoren wie Salze, Stoffwechselmetabolite und CO_2 die Funktionsweise des Hämocyanins beeinflussen. Auch können die respiratorischen Eigenschaften der Spinnenhämocyanine nur mit Vorbehalt interpretiert werden, da weder die inneren O_2- und CO_2-Partialdrucke, noch die Zirkulation der Hämolymphe und andere physiologische Parameter untersucht worden sind. Unabhängig von diesen Bedenken lassen sich die gewonnenen Daten durchaus mit denen von Hämocyaninen zahlreicher anderer Arthropoden und Mollusken vergleichen.

Die Sauerstoffaffinität der Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius ist

hoch (albsättigungskonzentration bei 25°C und physiologischem pH etwa 10 µM O_2/l = 6-7 mm Hg O_2). Sie entspricht den Halbsättigungsdrucken, die man unter vergleichbaren Bedingungen (25°C, physiologischer pH) bei Hämocyaninen von Crustaceen, wie Cardisoma guanhumi (Halbsättigung bei 5 mm Hg, REDMOND, 1962a), Panulirus argus (Halbsättigung bei 6 mm Hg, REDMOND in GHIRETTI, 1968), Procambarus simulans (Halbsättigung bei 3 mm Hg, LARIMER und RIGGS, 1964) gefunden hat. Eine gleichermaßen hohe Affinität zeigt das Hämocyanin von Limulus polyphemus (Halbsättigung bei 8 mm Hg, bei pH 7,35 und 25°C, REDFIELD und INGALLS, 1933). Das Hämocyanin eines Skorpions, Heterometrus fulvipes, hat dagegen eine niedrigere Affinität (Halbsättigung bei 17 mm Hg unter oben genannten Bedingungen, PADMANABHA-NAIDU, 1966). Noch niedriger ist die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins einer semiterrestrischen, besonders aktiven Krabbe, Ocypode quadrata (Halbsättigung bei 30 mm Hg, REDMOND in GHIRETTI, 1968) und die der Hämocyanine der ebenfalls sehr aktiven Cephalopoden, wie z. B. Loligo pealei (Halbsättigung etwa um 100 mm Hg bei physiologischem pH und 23°C, DE PHIL-LIPS et al., 1969). Der Vergleich zeigt, daß die Hämocyanine sehr aktiver Tiere mit erhöhtem Sauerstoffbedarf und die von Tieren mit terrestrischer und semiterrestrischer Lebensweise eine niedrigere Sauerstoffaffinität (und einen stärkeren Bohreffekt, wie noch zu zeigen ist) besitzen, als die weniger aktiven Tiere, die, oft im Sand vergraben, in sauerstoffarmem Biotop leben (z. B. Limulus). Vergleichbare Zusammenhänge zwischen respiratorischen Eigenschaften und Lebensbedingungen sind auch von Hämoglobinen bekannt: Die Hämoglobine einer im Sand vergrabenen Polychaetenspezies, Arenicola, besitzen eine hohe Sauerstoffaffinität (Halbsättigung bei 3 mm Hg bei 20°C und pH 6,9, PROSSER und BROWN, 1961); das Hämoglobin des trägen, in sauerstoffarmem Wasser lebenden Karpfens zeigt eine höhere Affinität als das der aktiven, in sauerstoffreichem Wasser lebenden Forelle (Halbsättigung des Karpfen-Hämoglobins bei 5 mm Hg, des Forellen-Hämoglobins bei 18 mm Hg; Temperatur 15°C, 1-2 mm Hg CO_2, PROSSER und BROWN, 1961). Die Hämoglobine von terrestrischen Schildkröten zeigen eine höhere Sauerstoffaffinität als die der im Wasser lebenden (PROSSER und BROWN, 1961). Diese Ähnlichkeiten in den respiratorischen Eigenschaften zwischen Hämocyaninen unterschiedlicher Spezies einerseits,und zwischen Hämocyaninen und Hämoglobinen andererseits, zeigen, daß vergleichbare Lebensbedingungen,

unabhängig von genetischen und stammesgeschichtlichen Zusammenhängen, zu ähnlichem funktionellen Verhalten führen.

Das Hämocyanin der Spinnen besitzt einerseits eine hohe Sauerstoffaffinität, wie sie für Hämocyanine wenig aktiver Tiere charakteristisch ist, andererseits aber einen ausgeprägten Bohreffekt, kennzeichnend für Hämocyanine aktiver Tiere. Zieht man die periodisch aktive Lebensweise von Dugesiella in Betracht, so könnten diese scheinbar widersprüchlichen Eigenschaften von physiologischer Bedeutung sein: Dugesiella hat als dämmerungs- und nachtaktives Tier bei den niedrigen Nachttemperaturen einen erhöhten Sauerstoffbedarf. Nun besitzt das Hämocyanin von Dugesiella bei niedrigeren Temperaturen zwar eine sehr hohe Sauerstoffaffinität, die die Sauerstoffabgabe an die Gewebe erschweren würde (Halbsättigungskonzentration bei 15°C und pH 8,05, 3 µM O_2/l), gleichzeitig aber einen erhöhten Bohreffekt ($\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta pH$ = ~ 1,05; bei 15°C). Hohe Affinität und starker Bohreffekt ermöglichen eine verbesserte Sauerstoffaufnahme und -abgabe, die den erhöhten Sauerstoffbedarf während der aktiven Periode befriedigen könnte. Daß die hohe Sauerstoffaffinität des Spinnenhämocyanins auch noch in anderer Hinsicht physiologisch bedeutsam ist, wird noch diskutiert werden (s. S.56).

Die Änderung der Sauerstoffaffinität betrifft Lage (Bohreffekt), Form (Änderung der Kooperativität) und absolute Höhe (Rooteffekt) der Sauerstoffbindungskurve.

Die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius zeigen im physiologischen pH-Bereich einen positiven Bohreffekt, der bei Dugesiella, wie Abbildung 8 (s. S. 21) zeigt, besonders stark ausgeprägt ist. Der positive Bohreffekt kommt durch negative Wechselwirkung zwischen H^+- und O_2-bindenden Zentren zustande (d. h., die Anlagerung von O_2-Molekülen behindert die Anlagerung von Protonen). Dabei kann es, wie z. B. ANTONINI et al. (1964a, zit. von ANTONINI und BRUNORI, 1971) aus dem raschen Abfall des Halbsättigungsdrucks (von ca. 20 mm Hg auf 4 mm Hg, innerhalb einer pH-Einheit) bei Hämoglobin von Lampetra planerii gefolgert haben, zu positiver homotroper Wechselwirkung (Kooperation) zwischen den verschiedenen H^+-bindenden Zentren kommen. Bei Dugesiella-Hämocyanin fällt die Halbsättigungskonzentration gleichfalls steil ab (von 32 µM O_2/l auf 8 µM O_2/l, innerhalb 0,75 pH-

Einheiten); daher kann man auch hier Kooperation von H^+-bindenden Zentren annehmen. Hämocyanin von Cupiennius zeigt demgegenüber einen weniger steilen Abfall der Halbsättigungskonzentration. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß in der Hämolymphe von Cupiennius möglicherweise mehr als eine Spezies Hämocyanin vorliegen, so daß die gemessene Kurve aus dem Zusammenwirken beider Hämocyanine resultiert.

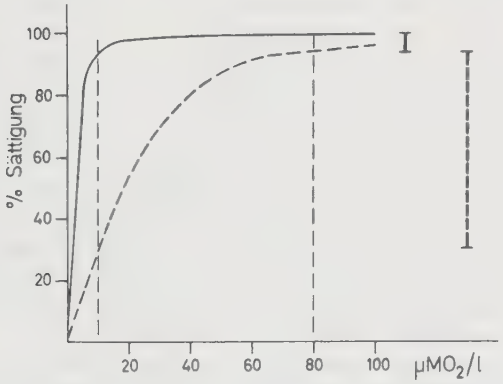

Abbildung 27. Steigerung der O_2-Abgabe durch den Bohreffekt bei Hämocyanin aus Dugesiella; O_2-Bindungskurve bei pH 7,3 (durchgezogene Kurve), O_2-Bindungskurve bei pH 8,05 (gestrichelte Kurve). O_2-Abgabe bei Erniedrigung der O_2-Konzentration von 80 µM O_2/l auf 10 µM O_2/l: 5,5 % des gebundenen O_2; O_2-Abgabe mit Bohreffekt: 5,5 + 64 = 69,5 % des gebundenen O_2; Temperatur 15°C.

Wie bereits ausgeführt, ist der ausgeprägte Bohreffekt des Dugesiella-Hämocyanins kennzeichnend für relativ aktive Tiere, wie Loligo pealei (DE PHILLIPS et al., 1969), Homarus americanus (REDFIELD und INGALLS, 1933) und Crangon vulgaris (DJANGMAH und GROVE, 1971); auf seine physiologische Bedeutung im Zusammenhang mit der Lebensweise von Dugesiella wurde bereits hingewiesen. Niedrige Bohreffekte findet man dagegen bei vergleichsweise inaktiven Tieren, wie den Chitonschnecken Mopalia muscosa, Katherina tunicata (REDMOND, 1962b), Helix pomatia (SPOEK et al.,1964)

und Procambarus simulans (LARIMER und RIGGS, 1964). Abbildung 27 (S. 47) demonstriert am Beispiel von Dugesiella, daß die physiologische Bedeutung des Bohreffekts in der verbesserten O_2-Abgabe an die Gewebe besteht: Bei Erniedrigung der O_2-Konzentration von 80 µM O_2/l auf 10 µM O_2/l und des pH von pH 8,05 auf pH 7,3 werden mit Bohreffekt ca. 1200 % mehr O_2 als ohne Bohreffekt abgegeben. Ob der Bohreffekt bei der O_2-Abgabe von Dugesiella- und Cupiennius-Hämocyanin tatsächlich eine so wesentliche Rolle spielt, kann wegen der fehlenden Daten über pH-Änderungen in Gewebsnähe und über die respiratorischen Eigenschaften in vivo nicht entschieden werden.

Der Bohreffekt kann bei Hämoglobin von der Temperatur in seiner Form, seiner Lage entlang der pH-Achse und seiner Größe beeinflußt werden (ANTONINI und BRUNORI, 1971): So steigt z. B. der Bohreffekt von Humanhämoglobin mit sinkender Temperatur (ANTONINI et al., 1965b, zit. von ANTONINI und BRUNORI, 1971). Bei Hämocyanin von Dugesiella steigt der Bohreffekt gleichfalls mit sinkender Temperatur, d. h., die negative heterotrope Wechselwirkung zwischen H^+- und O_2-bindenden Zentren nimmt zu (physiologische Bedeutung s. S. 46).

Die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius zeigen neben dem positiven auch einen negativen Bohreffekt; er wird hervorgerufen durch positive Wechselwirkung von H^+- und O_2-bindenden Zentren. Während der negative Bohreffekt vor allem bei schalentragenden Schnecken, wie Fusitriton orogenese, Fasciolaria tulipa (REDMOND in GHIRETTI, 1968) oder bei Homarus americanus (REDFIELD und INGALLS, 1933) sehr ausgeprägt ist und möglicherweise physiologisch signifikant, ist er bei Spinnen-Hämocyanin gering und liegt weit außerhalb des physiologischen pH-Bereichs. Es dürfte daher sicher sein, daß der negative Bohreffekt keine physiologische Bedeutung hat.

Kooperativität: Wie erwähnt (s. S. 17, 24), verlaufen die Sauerstoffbindungskurven von Dugesiella und Cupiennius unter bestimmten Voraussetzungen sigmoid; sie zeigen damit eine Eigenschaft, wie sie für die meisten respiratorischen Pigmente typisch ist. Der sigmoide Kurvenverlauf geht auf positive Interaktion = Kooperation der O_2-bindenden Zentren zurück. Der Hill-Parameter n bei Halbsättigung von Dugesiella- und Cupiennius-Hämocyanin

hat im pH-Bereich der Hämolymphe bei 25° Werte um 2; er entspricht daher den n-Werten zahlreicher anderer Hämocyanine (PADMANABHANAIDU, 1966; REDMOND, 1962a, JOHNSTON und BARBER, 1967; REDFIELD und INGALLS, 1933). Der Hill-Parameter steigt mit der Temperatur und kompensiert dadurch teilweise die sinkende O_2-Affinität.

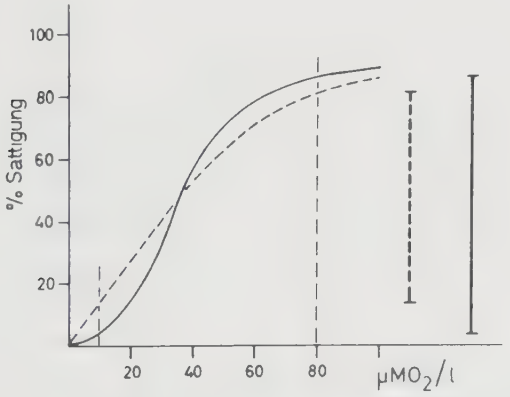

Abbildung 28. Erhöhung der O_2-Abgabe durch Zunahme der Kooperativität bei Erniedrigung der O_2-Konzentration von 80 µM O_2/l auf 10 µM O_2/l; - - - O_2-Abgabe ohne Kooperation (68 % des gebundenen O_2), ——— O_2-Abgabe mit Kooperation (83 % des gebundenen O_2). Die Kurven sind konstruiert, sie besitzen die gleiche Halbsättigungskonzentration.

Die Kooperativität der Spinnenhämolymphe ändert sich im Meßbereich mit dem pH-Wert. Jedoch sinkt der Hill-Parameter bei 25° nur wenig unter n = 2: Nach WYMAN (1964) bedeutet das, daß mindestens 2 O_2-bindende Untereinheiten kooperieren. Auch aus den Meßdaten anderer Autoren läßt sich ein ähnliches Verhalten ablesen (Heterometrus fulvipes, PADMANABHANAIDU, 1966; Crangon vulgaris, DJANGMAH und GROVE, 1971; Panulirus interruptus, JOHNSTON und BARBER, 1967; Chiton-Arten, REDMOND, 1962b; Loligo pealei, DE PHILLIPS et al., 1969; Fisch-Hämoglobine, ROSSI FANELLI und ANTONINI, 1960). Das Phänomen und seine physiologische Signifikanz ist bisher jedoch nicht erkannt

worden. Bei einem Teil der oben genannten Hämocyanine (Heterometrus, Crangon) fällt auf, daß der pH-abhängige Verlauf der Affinität und der Kooperativität negativ korreliert sind. Bei den Spinnenhämocyaninen ist der Kurvenverlauf des Hill-Parameters gegen den der Halbsättigungskonzentration ins Alkalische verschoben (s. Abbildung 29); deshalb kann man nicht von einem engen Zusammenhang zwischen beiden Größen sprechen. Fest steht jedoch, daß die Kooperativität bei etwa pH 8,0 und hoher Affinität geringer ist als bei pH 7,0 und geringer Affinität. Dieser Zusammenhang - niedrige Affinität - hohe Kooperativität - zeigt, daß die physiologische Bedeutung der Kooperativitätszunahme in der Verbesserung der O_2-Abgabe in den Geweben zu sehen ist; Gleiches gilt für die Kooperativitätszunahme mit steigender Temperatur. Abbildung 28 (S. 49) zeigt am Beispiel konstruierter Kurven, daß bei zunehmender Kooperativität deutlich mehr O_2 abgegeben werden kann.

Die Änderung des Quotienten E_{340}^{max} / E_{278} - ein umgekehrter Rooteffekt?

Nach MANWELL (1964) ist der Rooteffekt "die reversible Abnahme der Sauerstoffkapazität bei zunehmender Azidität ...". Er interpretiert diesen Effekt auf Grund seiner Ergebnisse bei Hämoglobinen teleostischer Fische (MANWELL, 1960) als Folge der pH-Abhängigkeit negativer Häm-Häm-Interaktionen. Daß es negative Interaktionen zwischen O_2-bindenden Gruppen gibt, ebenso, daß im Verlauf einer O_2-Bindungskurve positive und negative Interaktionen zwischen O_2-bindenden Zentren auftreten können, geht für Hämoglobine aus einer Reihe von Untersuchungen hervor (TAKASHIMA, 1955; MANWELL, 1957; SCHOLANDER, 1957; MURAYAMA, 1960; alle zit. von MANWELL, 1964). Für negative Interaktion von O_2-bindenden Stellen von Hämocyaninen gibt es ebenfalls Hinweise (Loligo pealei, DE PHILLIPS et al., 1969; Helix pomatia, KONINGS et al., 1969). Auch die wellenförmigen O_2-Bindungskurven mancher Schnecken-Hämocyanine, z. B. von Busycon (REDFIELD, 1934) können nach MANWELL (1964) als Folgen negativer Interaktion interpretiert werden. ANTONINI und BRUNORI (1971) weisen darauf hin, daß der Rooteffekt möglicherweise auf dem Zusammenwirken von unabhängigen O_2-Bindungsstellen mit unterschiedlichen O_2-Affinitäten beruht.

Ob die eine oder andere Möglichkeit die Ursache für die Änderung der spezifischen Extinktion ist, oder ob es sich um einen unspezifischen Effekt handelt, läßt sich gegenwärtig nicht entscheiden. Ist es ein spezifischer

Effekt, also eine pH-abhängige Änderung der O_2-Kapazität, dann zeigen die Spinnenhämocyanine einen "umgekehrten Rooteffekt", d. h., die Kapazität sinkt mit steigender Affinität. Ein solcher Zusammenhang scheint jedoch nicht physiologisch sinnvoll. Angemerkt sei noch, daß KONINGS et al. (1969) für α- und β-Hämocyanin von Helix pomatia unterschiedliche Quotienten E^{max}_{340} / E_{278} finden, deren Größe mit dem Kupfergehalt der Komponenten korreliert ist.

2. Einheitlichkeit der Hämolymphe proteine

Bei Mollusken und Arthropoden, die Hämocyanin als Atempigment besitzen, findet man außer Hämocyanin meistens kein anderes Protein in der Hämolymphe. Für die Hämolymphe von Dugesiella kann man ebenfalls sicher annehmen, daß sie außer Hämocyanin kaum Fremdprotein enthält, und daß das Hämocyanin selbst einheitlich ist. Als Kriterien hierfür wären zu nennen: Hoher prozentualer Kupfergehalt, der dem gereinigter Hämocyanine entspricht, und die Ergebnisse der Isoelektrofokussierung, Disk-Elektrophorese und Sedimentationsanalyse.

Für die Hämolymphe proteine von Cupiennius ist diese Einheitlichkeit nicht gegeben: Der prozentuale Kupfergehalt liegt unter dem von Dugesiella-Hämolymphe, die Bilder der Disk-Elektrophoresen zeigen mehrere kräftige Banden. Bei den Sedimentationsanalysen erweisen sich zudem die Gipfel der 24 S- und der 16 S-Komponente gegen Ende der Sedimentation als unsymmetrisch bis mehrgipflig. Dafür gibt es mehrere Erklärungen:

1. Unsymmetrische Gipfel treten häufig auf bei Proteinen, deren Sedimentationskoeffizient konzentrationsabhängig ist (ELIAS, 1969). Dies trifft hier sicher nicht zu, da auch die 37 S-Komponente aus Dugesiella-Hämolymphe nicht als unsymmetrischer "Peak" wandert.
2. Die unregelmäßige Form der Gipfel folgt aus einem sich während des Laufs neu einstellenden Dissoziations-Gleichgewichts (GILBERT, 1959). Dies ist ausgeschlossen, da die Komponenten diskret wandern, und zwischen ihnen keine Erhöhung der Basislinie beobachtet wurde.
3. Unter einem "Peak" wandert mehr als eine Komponente. Diese Möglichkeit wird für die wahrscheinlichste gehalten, doch kann sie zwei Ursachen haben: Die Komponenten enthalten neben Hämocyanin noch Fremdprotein, oder sie ent-

halten verschiedene Hämocyaninspezies. Abgesehen davon, daß die 16 S-Komponente Fibrinogen enthalten kann, sprechen zwei Argumente für die Annahme, daß es sich um nicht einheitliche Hämocyanine handelt; nämlich einmal das hohe Molekulargewicht (24 S ca. 950 000, 16 S ca. 480 000), und zum andern das pH-abhängige Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht der Komponenten, das für Hämocyanine typisch ist. Auch die Sedimentationskoeffizienten von α- und β-Hämocyanin aus Helix pomatia unterscheiden sich nur geringfügig (α-Hämocyanin: 104,2 S, 65,7 S, 19,0 S; β-Hämocyanin: 105,7 S, 65,7 S, 18,8 S; WITTERS und LONTIE, 1968); sie können daher durch Sedimentationsanalyse nicht identifiziert werden. Es soll hier noch erwähnt werden, daß sich die 5-6 S-Komponente sowohl aus Dugesiella- als auch aus Cupiennius-Hämocyanin bei den Sedimentationsanalysen nicht einheitlich verhält. Die gleiche Beobachtung machen ERIKSON-QUENSEL und SVEDBERG (1936) bei den entsprechenden Komponenten aller untersuchter Crustaceen, ebenso ELLERTON et al. (1970) bei Cancer magister. Auf Grund dieser Inhomogenität diskutieren ELLERTON et al., daß verschiedenartige - "strukturelle" und "funktionelle" - Untereinheiten das Hämocyanin aufbauen.

3. Hämocyaninkomponenten

Die Hämolymphe der Spinnen enthält als kleinste eine 5 S- (Cupiennius) bis 6 S-Komponente (Dugesiella); ihr Molekulargewicht beträgt etwa 70 000 (Cu/Protein-Relation) bis 85 000 Dalton (Elektrophorese). Dieses Molekulargewicht stimmt gut mit dem von 75 000-80 000 Dalton überein, das ELLERTON et al. (1970) für die 5 S-Komponente von Cancer magister bestimmt haben. Diese kleinste funktionelle Einheit findet man bei allen untersuchten Crustaceen-Hämocyaninen und bei Limulus polyphemus (ERIKSON-QUENSEL und SVEDBERG, 1936; JOHNSTON et al., 1967; ELLERTON et al., 1970; MORIMOTO und KEGELES, 1971). Cupiennius-Hämocyanin besteht im physiologischen pH-Bereich aus zwei Hauptkomponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 16 S und 24 S. Diese sind ebenfalls die Hauptkomponenten der Crustaceen-Hämocyanine. Die Hauptkomponente (37 S) von Dugesiella-Hämocyanin findet man bei Crustaceen nicht, wohl aber bei der Vogelspinne Avicularia metallica und dem Skorpion Hadogenese bicolor; sie findet sich auch bei Limulus polyphemus, jedoch ist der im elektronenmikroskopischen

Bild sichtbare Aufbau des tetrameren Moleküls deutlich von dem der Arachniden zu unterscheiden (VAN BRUGGEN in GHIRETTI, 1968).

4. Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht

Die Hämocyaninkomponenten von Dugesiella sowie Cupiennius stehen miteinander in einem für Hämocyanine typischen, pH-abhängigen Gleichgewicht. Der pH-Stabilitätsbereich, innerhalb dessen keine Dissoziation stattfindet, erstreckt sich bei Dugesiella vom Beginn des Meßbereichs, bei pH 5,8, bis pH 8,85; danach setzt schlagartig die Dissoziation in die 6 S-Untereinheiten ein. Die über ca. 0,4 pH-Einheiten verlaufende Dissoziation läßt sich nur mit einem kooperativen Prozeß erklären. Auch Denaturierung von Lysozym durch Guanidinium-Hydrochlorid kann ein kooperativer Prozeß sein (TANFORD et al., 1969). Der pH-Stabilitätsbereich von Cupiennius erstreckt sich von pH 6,5 bis etwa pH 8,7; die "Dissoziationskurve" fällt weniger steil ab als bei Dugesiella, selbst im stark alkalischen Bereich findet man immer noch etwa 30 % als 16 S-Komponente. Unter pH 6,5, am sauren Ende des Dissoziationsbereichs, verschiebt sich das Gleichgewicht, im Gegensatz zur alkalischen Dissoziation, weit zugunsten der 16 S-Komponente (80 % bei pH 5,8).

Vergleicht man die Dissoziation der Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius mit der von Crustaceen-Hämocyaninen, so fällt auf, daß deren Dissoziation weiter im alkalischen Bereich erfolgt, frühestens ab pH 9,5 bis pH 10,0 (ERIKSON-QUENSEL und SVEDBERG, 1936). Dies ist möglicherweise der höheren Molarität (0,2 m und höher) der von ERIKSON-QUENSEL und SVEDBERG verwendeten Puffer zuzuschreiben. Dagegen waren die Puffer für die Untersuchungen der Spinnenhämolymphe weniger konzentriert (Ionenstärke 0,1). Auch die Dissoziation der Hämocyanine von Cancer magister (ELLERTON et. al., 1970) und Panulirus interruptus (JOHNSTON et al., 1967) erfolgt wie die der Spinnen bereits bei niedrigerem pH (pH 8-9); beide Autoren verwendeten ebenfalls niedrige Pufferkonzentrationen (μ = 0,1 bzw. M = 0,02). Bei Crustaceen-Hämocyaninen erstreckt sich der pH-Stabilitätsbereich bis weit in den sauren pH-Bereich hinein (etwa bis pH 3,5) im Gegensatz zu Hämocyanin von Cupiennius; Dugesiella-Hämocyanin dissoziiert im sauren Meßbereich nicht (letzter Meßpunkt pH 5,8).

In Gegenwart von Mg^{++} wird bei Hämocyanin aus Cupiennius einerseits der Stabilitätsbereich weiter ausgedehnt, zum andern erhöht sich innerhalb des Stabilitätsbereichs der Anteil der hochmolekularen 24 S-Komponente auf 50 %; die 5 S-Komponente verschwindet ganz. Bei Dugesiella-Hämocyanin bewirkt Mg^{++}-Zusatz, daß die 37 S-Komponente im gesamten Meßbereich nicht dissoziiert. Auch bei anderen Hämocyaninen, wie dem von Cancer magister (ELLERTON et al., 1970) und dem von Loligo pealei (VAN HOLDE und COHEN, 1965) wird durch Zusatz von Mg^{++} die Dissoziation weiter ins Alkalische verschoben (ab pH 10,5 bzw. 10,0). Die Mg^{++}-Konzentration war hierbei ebenso hoch wie bei den Sedimentationsanalysen der Spinnen-Hämocyanine (0,01 m); sie entspricht der zehnfachen Mg^{++}-Konzentration, die RATHMAYER (1965) für die Hämolymphe von Dugesiella angibt.

Die Reassoziierungsversuche mit Hämocyanin von Dugesiella demonstrieren, daß die Dissoziation reversibel ist. Dabei zeigt sich, daß die Reassoziation nach dem Übergang von pH 10,2 nach pH 7,0 schneller erfolgt als nach Mg^{++}-Zusatz bei gleichbleibend alkalischem pH-Wert. Erstaunlicherweise werden im Versuchszeitraum sogar 37 S-Moleküle reassoziiert, wogegen bei Cancer magister (ELLERTON et al., 1970) unter vergleichbaren Bedingungen nur die 16 S-, nicht aber die 24 S-Komponente entsteht.

5. Elektronenmikroskopie

Der makromolekulare Aufbau des Spinnenhämocyanins entspricht bis zum Dimer dem der Crustaceen-Hämocyanine. Dabei assoziieren zwei Monomere (16 S) zum Dimer; dieses kann darüber hinaus mit einem weiteren Dimer zu einem Tetramer (37 S) assoziieren. Das Tetramer entspricht in Aussehen und Abmessungen den Tetrameren in den beiden Bildern, die von VAN BRUGGEN (in GHIRETTI, 1968) für Avicularia metallica und Hadogenese bicolor publiziert worden sind.

Die Substruktur der Monomeren ist hinsichtlich Zahl und Anordnung der Untereinheiten schwierig zu interpretieren. Dennoch soll versucht werden, aus den sichtbaren Strukturen, dem hypothetischen Molgewicht des Monomers unter Annahme gleich großer Untereinheiten gewisse Bauprinzipien abzuleiten.

Unterstellt man nämlich dem "Monomer" ein Molgewicht von 480 000 Dalton, wie es für die entsprechende Komponente von Cancer magister bestimmt wurde (ELLERTON et al., 1970), so gibt es bezüglich Zahl und Größe der Untereinheiten drei Möglichkeiten:

1. 4 Untereinheiten à 120 000 Dalton (im EM-Bild: quadratische Struktur)
2. 6 Untereinheiten à 80 000 Dalton (im EM-Bild: Hexagon)
3. 7 Untereinheiten à 70 000 Dalton (im EM-Bild: Hexagon mit "Mittelkörper").

Ob eine und welche dieser Modellvorstellungen zutrifft, kann wegen der zu geringen Auflösung nicht entschieden werden. Auf Grund des für die kleinste Einheit ermittelten Molekulargewichts müßte man dem Modell "6 Untereinheiten à 80 000 Dalton" den Vorzug geben. Daneben könnte es vor allem bei Cupiennius auch ein quadratisches Monomer mit "4 Untereinheiten zu je 120 000 Dalton" geben. Das dritte Modell ist weniger wahrscheinlich, da eine Komponente mit 70 000 Dalton zwar rechnerisch ermittelt, experimentell jedoch nicht gefunden wurde. Überdies ist denkbar, daß die im elektronenmikroskopischen Bild sichtbare hexagonale Struktur mit "Mittelkörper" in Wirklichkeit die Aufsicht auf die Spitze eines Würfels darstellt; dadurch wird anstelle der quadratischen eine hexagonale Struktur vorgetäuscht. VAN BRUGGEN et al. (1963) gelangen bei Crustaceen-Hämocyaninen zu gleichartigen Modellvorstellungen. Die dritte elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur ("Rechteck") kann sowohl die Seitenansicht der hexagonalen als auch die der quadratischen Struktur darstellen, oder einen eigenen Typus.

6. Die respiratorische Bedeutung des Spinnenhämocyanins

Die Bedeutung des Hämocyanins als respiratorisches Pigment wird heute kaum noch angezweifelt (REDMOND in GHIRETTI, 1968). Sie ist aber neben der eigentlichen Transportfunktion unter zwei weiteren Aspekten zu sehen, die nicht ohne weiteres auf der Hand liegen: a) Erhaltung eines O_2-Konzentrationsgradienten an der respiratorischen Oberfläche und b) Funktion als O_2-Speicher.

a) Eine der wichtigsten respiratorischen Funktionen des Hämocyanins sieht REDMOND (in GHIRETTI, 1968) darin, daß es, indem es die eindiffundierenden O_2-Moleküle aufnimmt und weitertransportiert, den O_2-Partialdruck auf der Innenseite der respiratorischen Membran niedrig hält; dadurch bleibt der

Konzentrationsgradient über die respiratorische Membran steil, die Diffusion verlangsamt sich nicht.

b) Außer dieser kommt dem Hämocyanin eine Speicherfunktion zu: Es erhöht den O_2-Gehalt der Hämolymphe beträchtlich, so daß den Geweben bei gleicher zirkulatorischer Leistung pro Zeiteinheit mehr Sauerstoff zugeführt werden kann. Wie die folgende Rechnung zeigt, unterscheidet sich bereits bei Atmosphärendruck (Gesamtdruck 760 mm Hg = 160 mm Hg O_2) die Menge des gesamten Sauerstoffs (Summe von gebundenem und physikalisch gelöstem Sauerstoff) erheblich von der des physikalisch gelösten allein:

Bei Atmosphärendruck lösen sich physikalisch 0,025 x 160/760 ≡ 5,3 µl O_2/ml in der Hämolymphe.

Dabei gibt der Wert 0,025 den Bunsenschen Absorptionskoeffizienten in ml O_2/ml von Trispuffer pH 8,05 (in etwa pH der Hämolymphe) bei 25°C an.

Bei Atmosphärendruck ist das Hämocyanin praktisch zu 100 % mit O_2 gesättigt; daher können 22,4 x 66/85 = 17,4 µl O_2/ml an das Hämocyanin gebunden werden.

Die Rechnung setzt voraus, daß alles Protein in der Hämolymphe (66 mg/ml) Hämocyanin ist (Molgewicht der kleinsten funktionellen Einheit 85 000 Dalton), und daß bei 100 % Sättigung alle spezifischen Bindungsstellen mit O_2 besetzt sind, d. h., daß kein Rooteffekt vorliegt.

Demnach erhöht sich bereits bei Atmosphärendruck der Sauerstoffgehalt der Hämolymphe von 5,3 µl O_2/ml auf 22,7 µl O_2/ml, also auf das Vierfache.

Der Sauerstoffpartialdruck der Hämolymphe liegt jedoch bei allen bisher untersuchten Spezies weit unter dem der Atmosphäre. Beispielsweise beträgt der Sauerstoffpartialdruck postbranchialer Hämolymphe von Busycon canaliculatum 36 mm Hg (FLORKIN, 1934, zit. von REDMOND, 1968). In postbranchialer Hämolymphe von Crustaceen wurden niedrigere Werte gefunden (5-8 mm Hg O_2, REDMOND in GHIRETTI, 1968). In der pericardialen Hämolymphe von Gecarcinus lateralis, einer Krabbe, die wegen ihrer terrestrischen Lebensweise den

Spinnen am ehesten vergleichbar ist, fand REDMOND (in GHIRETTI, 1968) einen Sauerstoffpartialdruck von 31 mm Hg. Eine Rechnung, der dieser Druck zugrunde liegt, dürfte daher eher die Konzentrationsverhältnisse des Sauerstoffs in der Hämolymphe darstellen:

Bei einem Sauerstoffpartialdruck von 31 mm Hg löst sich physikalisch nur noch 0,025 x 31/760 ≡ 1,0 µl O_2/ml in der Hämolymphe. Dagegen ist das Hämocyanin bei den gegebenen Bedingungen immer noch zu 97 % gesättigt; es kann daher 22,4 x 0,97 x 66/85 = 16,9 µl O_2/ml binden. Somit erhöht sich der Sauerstoffgehalt der Hämolymphe von 1,0 µl O_2/ml auf 17,9 µl O_2/ml, d. h. auf das Achtzehnfache. Bei Annahme noch geringerer innerer Sauerstoffpartialdrucke, wie z. B. von 6 mm Hg O_2 (Cardisoma guanhumi, REDMOND in GHIRETTI, 1968), löst sich in Gegenwart von Hämocyanin sogar die vierzigfache Menge des physikalisch gelösten Sauerstoffs in der Hämolymphe.

Die Bedeutung des Hämocyanins erhellt also aus seiner Fähigkeit, gerade bei sehr niedrigen Sauerstoffpartialdrucken noch viel Sauerstoff zu binden und die Gesamtkapazität der Hämolymphe auf ein Vielfaches zu erhöhen. Der Energieumsatz ist bei Spinnen wohl allgemein niedrig (ANDERSON, 1969), so daß bei genügend rascher Zirkulation vielleicht die Versorgung mit physikalisch gelöstem Sauerstoff ausreichen könnte; es gibt jedoch Phasen gesteigerter Aktivität (Beutefang, Flucht) mit einem Spitzenbedarf an Sauerstoff. Diese Bedarfsspitzen könnten z. B. aus dem Hämocyaninspeicher gedeckt werden.

Die respiratorischen Eigenschaften des Hämocyanins und ihre Änderung mit dem pH-Wert können - bis auf das Verhalten der "Kapazität" - in einem sinnvollen Zusammenhang mit der Sauerstoffaufnahme und -abgabe gesehen werden (Abbildung 29): Die hohe Affinität bei dem pH-Wert der Hämolymphe ermöglicht, daß das Hämocyanin weitgehend beladen wird. Durch die Abnahme der Affinität (Bohreffekt) und die Zunahme der Kooperativität mit sinkendem pH kann an die Gewebe sehr viel mehr Sauerstoff abgegeben werden, als dies auf Grund der Partialdruckdifferenz allein möglich wäre.

Es ist möglich, daß in der Spinnenhämolymphe in vivo sich die respiratorischen Parameter verändern: Die Sauerstoffbindungskurven von Crangon vulgaris (DJANGMAH und GROVE, 1971) zeigen nämlich, daß ein eindeutiger

Zusammenhang zwischen den respiratorischen Eigenschaften und der Ionenstärke der verwendeten Puffer besteht: Bei einer Ionenstärke von 0,1 ist der Halbsättigungsdruck nahezu doppelt so hoch wie bei einer Ionenstärke von 0,2 (69,5 mm Hg gegenüber 39,5 mm Hg bei pH 8,0). Wie sich aus den Daten ferner andeutungsweise erkennen läßt, sinkt das Ausmaß des Bohreffekts mit wachsender Ionenkonzentration stark ab, hingegen steigt die Kooperativität (von n = 4 bei μ = 0,1 auf n = 7,5 bei μ = 0,28; pH 8,5). Gleichsinnig verhält sich Humanhämoglobin (ANTONINI und BRUNORI, 1971). Falls eine gleiche Abhängigkeit auch für die Spinnenhämocyanine zuträfe, müßte man annehmen, daß in vivo der Bohreffekt tatsächlich nur eine geringe, die Änderung der Kooperativität hingegen eine wesentliche Rolle spielt.

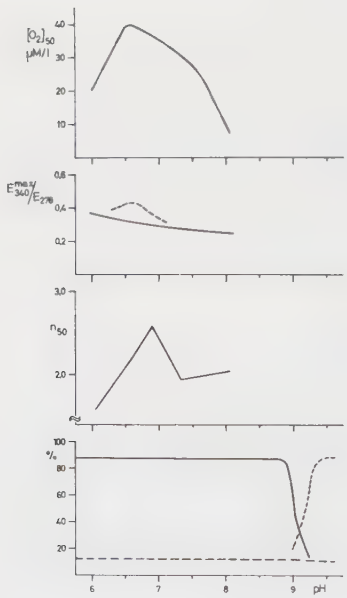

Abbildung 29. Vergleich aller gemessenen Parameter. Reihenfolge von oben nach unten:
Änderung der Halbsättigungskonzentration (Bohreffekt), des Quotienten E^{max}_{340} / E_{278}, der Kooperativität und des Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichts (—— 37 S, — — 16 S, - - - 6 S) mit dem pH-Wert bei Hämocyanin aus Dugesiella.

Die Änderung der respiratorischen Eigenschaften erfolgt in einem pH-Bereich, innerhalb dessen die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius nicht disso-

ziieren (Abbildung 29); daher können Dissoziationsvorgänge nicht zur Erklärung der Veränderungen herangezogen werden, wie das JOHNSTON et al. (1967) und KONINGS et al. (1969) für die Änderung der Kooperativität annehmen. Die viel höhere Konzentration des Hämocyanins in der Hämolymphe (im Vergleich zu den Versuchen in vitro) wird zusätzlich das Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht völlig in Richtung des hochmolekularen Hämocyanins verschieben. Physiologisch relevante Änderungen der respiratorischen Eigenschaften sind also allein die Folge allosterischer Effekte.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Hämolymphe von Dugesiella und Cupiennius enthält als Hauptbestandteil Hämocyanin. Analytische Methoden (Isoelektrofokussierung, Elektrophorese und Sedimentationsanalyse) und hoher Kupfergehalt (Dugesiella 0,18 % Cu, Cupiennius 0,12 % Cu) zeigen, daß die Spinnenhämolymphe außer Hämocyanin kaum andere Proteine enthält. Die Proteinfraktion von Dugesiella-Hämolymphe kann auf Grund dieser Kriterien als einheitlich gelten; für Cupiennius-Hämolymphe trifft dies nicht zu, es gibt jedoch Hinweise (Polyacrylamid-Elektrophorese, Sedimentationsanalyse und Elektronenmikroskopie), daß die Hämolymphe von Cupiennius nicht verschiedene Proteine, sondern unterschiedliche Hämocyaninspezies enthält.

2. Die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius besitzen eine hohe Sauerstoffaffinität. (10 µM O_2/l bei physiologischem pH und 25°). Die Änderung der Sauerstoffaffinität betrifft Lage (Bohreffekt), Form (Kooperativität) und absolute Höhe (Kapazität) der Sauerstoffbindungskurve.

   Der positive Bohreffekt ist bei Dugesiella besonders stark ausgeprägt (Dugesiella: $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta pH = -0{,}809$ im pH-Bereich 7,30-8,05; dagegen Cupiennius: $\Delta \lg [O_2]_{50} / \Delta pH = -0{,}423$ im pH-Bereich 7,4-7,8; Temperatur 25°); Er steigt mit sinkender Temperatur. Der negative Bohreffekt ist gering und liegt außerhalb des physiologischen pH-Bereichs.

   Die Größe des Hill-Parameters n (n um 2 bei 25°) zeigt, daß wenigstens drei Untereinheiten des Hämocyanins in kooperativer Wechselwirkung stehen. Die Kooperativität steigt mit der Temperatur (n = 3,92 bei 35° und pH 8,05; Hämocyanin aus Dugesiella); sie ändert sich darüber hinaus mit dem pH-Wert. Bei neutralem pH (niedrige Affinität) ist die Kooperativität größer als bei dem pH der Hämolymphe, um pH 8 (hohe Affinität). Dieser Zusammenhang, hohe Kooperativität - niedrige O_2-Affinität, legt nahe, daß die physiologische Bedeutung der Kooperativitätsänderung in der verbesserten O_2-Abgabe an die Gewebe zu sehen ist.

   Der Quotient E^{max}_{340} / E_{278} sinkt mit steigendem pH. Es ist nicht entschieden, ob dies eine Änderung der Kapazität spiegelt, oder auf eine Änderung der spezifischen Absorption des $HcyCu_2O_2$-Komplexes beruht.

3. Das Molgewicht der kleinsten funktionellen Untereinheit wurde aus der Cu/Protein-Relation mit 70 600 Dalton (Dugesiella) und 106 000 Dalton (Cupiennius) berechnet; das durch Elektrophorese ermittelte Molekulargewicht beträgt für beide Spezies 85 000 Dalton. Diese kleinste Untereinheit entspricht der 5-6 S-Komponente, die aus den Sedimentationsanalysen bestimmt wurde.

4. Die Hämocyaninkomponenten von Dugesiella und Cupiennius zeigen ein charakteristisches Dissoziations-Assoziations-Verhalten, das vom pH-Wert und der Anwesenheit von Mg^{++} abhängt.

   Innerhalb des pH-Stabilitätsbereichs enthält die Hämolymphe von Dugesiella eine 37 S (Hauptkomponente) und eine 16 S-Komponente, die von Cupiennius hingegen zwei Hauptkomponenten mit 24 S und 16 S und eine 5 S-komponente. Außerhalb des Stabilitätsbereichs (etwa ab pH 9,0 bei Dugesiella, ab pH 8,8 bei Cupiennius) dissoziieren die Spinnen-Hämocyanine in Komponenten mit 5-6 S und 16 S.

   10 mM Mg^{++} verhindern bei Hämocyanin aus Dugesiella die Dissoziation über den gesamten Meßbereich. Bei Cupiennius-Hämocyanin wird im Stabilitätsbereich der Anteil der 24 S-Komponente erhöht und gleichzeitig der Stabilitätsbereich bis etwa pH 9,2 erweitert.

   Reassoziationsversuche zeigen, daß die Dissoziation zumindest teilweise reversibel ist.

   Durch Entfernung des Kupfers wird das Hämocyanin destabilisiert.

5. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, daß sich die Hämocyanine von Dugesiella und Cupiennius blockartig durch Dimerisation bzw. Tetramerisation aus einem Monomer (16 S) aufbauen; die Moleküle entsprechen in Aussehen und Dimensionen den Hämocyaninmolekülen von Avicularia metallica und Hadogenese bicolor (VAN BRUGGEN in GHIRETTI, 1968). Die monomeren Bausteine erscheinen als hexagonale, rechteckige und quadratische Moleküle mit schwierig zu interpretierender Substruktur.

6. Die physiologische Bedeutung der gemessenen Eigenschaften wird diskutiert. Es ergibt sich u. a., daß die Dissoziation in Untereinheiten, da sie außerhalb des physiologischen pH-Bereichs erfolgt, nicht für die Änderung der Sauerstoffaffinität verantwortlich ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANDERSON, J. F.: Metabolic rates of spiders. Comp. Biochem. Physiol. 33, 51-72 (1969).

ANTONINI, E., BRUNORI, M.: Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands (A. Neuberger and E. L. Tatum ed.). Amsterdam and London: North-Holland Publishing Company 1971.

BRENNER, S., HORNE, R. W.: A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110 (1959).

COHEN, L. B., VAN HOLDE, K. E.: Physical studies of hemocyanins. II. A comparison of the hemocyanin and apohemocyanin of Loligo pealei. Biochem. 3, 1809-1813 (1964).

COMSTOCK, J. H.: The spider book (W. J. Gertsch ed.). Ithaka, New York: Comstock Publishing Associates 1965.

DE PHILLIPS, H. A., NICKERSON, K. W., JOHNSON, M., VAN HOLDE, K. E.: Physical studies of hemocyanins. IV. Oxygen-linked disassoziation of Loligo pealei hemocyanin. Biochem. 8, 3665-3672 (1969).

DJANGMAH, J. S., GROVE, D. J.: Oxygen affinity of hemocyanin in diluted blood of Crangon. Comp. Biochem. Biophys. 38, 461-464 (1971).

EDEN, A., GREEN, H. M.: Microdetermination of copper in biological material. Biochem. J. 34, 1202-1203 (1940).

ELIAS, H. G.: Ultrazentrifugen-Methoden. München: Beckman Instruments GmbH 1969.

ELLERTON, H. D., CARPENTER, D. E., VAN HOLDE, K. E.: Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of Cancer magister. Biochem. 9, 2225-2232 (1970).

ERIKSON-QUENSEL, I. B., SVEDBERG, T.: The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. Biol. Bull. 71, 498-547 (1936).

FERNÁNDEZ-MORÁN, H., VAN BRUGGEN, E. F. J., OHTSUKI, M.: Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. J. Mol. Biol. 16, 191-207 (1966).

FULLER, G. M., DOOLITTLE, R. F.: Studies of invertebrate fibrinogen. I. Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. Biochem. 10, 1305-1311 (1971a).

----------: Studies of invertebrate fibrinogen. II. Transformation of lobster fibrinogen into fibrin. Biochem. 10, 1311-1315 (1971b).

GILBERT, G. A.: Sedimentation and electrophoresis of interacting substances I. Idealized boundary shape for a single substance aggregating reversibly. Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A: 250, 377-388 (1959).

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS (R. C. Weast ed.). Cleveland: The Chemical Rubber Co. 1969.

HILL, A. V.: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissoziation curves. J. Physiol. 40, IV-VII (1910).

INTERNATIONAL CRITICAL TABLES OF NUMERICAL DATA PHYSICS, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, Vol. III (E. W. WASHBURN ed.). New York: McGraw-Hill Book Company Inc. 1928.

JACOBS, S.: Determination of nitrogen in proteins by means of indanetrione hydrate. Nature (Lond.) 183, 262 (1959).

JOHNSTON, J. P., OGSTON, A. G.: A boundary anomaly found in the ultracentrifugal sedimentation of mixtures. Trans. Farad. Soc. 42, 789-799 (1946).

JOHNSTON, W., JAMES, T. W., BARBER, A. A.: Oxygen binding characteristics of lobster hemocyanin and its subunits. Comp. Biochem. Physiol. 22, 261-271 (1967).

KONINGS, W. N., VAN DRIEL, R., VAN BRUGGEN, E. F. J., GRUBER, M.: Structure and properties of hemocyanins V. Binding of oxygen and copper in Helix pomatia hemocyanin. Biochim. Biophys. Acta 194, 55-66 (1969).

LANG, C. A.: Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. Analyt. Chem. 30, 1692-1694 (1958).

LARIMER, J., RIGGS, A. F.: Properties of hemocyanins - I. The effect of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. 13, 35-46 (1964).

LOEWE, R., LINZEN, B., v. STACKELBERG, W.: Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, Cupiennius salei Keyserling. Z. vergl. Physiol. 66, 27-34 (1970).

LONG, C.: Biochemists' handbook. London: E. & F. Spon Ltd. 1961.

LUTZ, K.: Die Berechnung des Schwebekörper-Durchflußmessers. Regelungstechnik, 7, 355-360 (1959a).

--------: Durchflußmessung mit Schwebekörper-Durchflußmessern. Arch. Techn. Messen, Lieferg. 285, 197-198 (1959b).

MANWELL, C.: Comparative physiology: Blood pigments. Ann. Rev. Physiol. 22, 191-244 (1960).

----------: Chemistry, genetics, and function of invertebrate respiratory pigments - configurational changes and allosteric effects. In: Oxygen in the animal organism (F. Dickens and E. Neil ed.), p. 49-116. Oxford: Pergamon Press 1964.

MAURER, H. R.: Disk-Elektrophorese. Berlin: Walter de Gruyter & Co 1968.

MELCHERS, M.: Zur Biologie und zum Verhalten von Cupiennius salei (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. Zool. Jb., Abt. System., Ökol. und Geogr. 91, 1-90 (1963).

MORIMOTO, K., KEGELES, G.: Subunit interactions of lobster hemocyanin I. Ultracentrifuge studies. Arch. Biochem. Biophys. 142, 247-257 (1971).

PADMANABHANAIDU, B.: Physiological properties of the blood and hemocyanin of the scorpion Heterometrus fulvipes. Comp. Biochem. Physiol. 17, 167-181 (1966).

PROSSER, C. L., BROWN, F. A.: Comparative animal physiology. Philadelphia: W. B. Saunders 1961.

RATHMAYER, W.: Neuromuscular transmission in a spider and the effect of calcium. Comp. Biochem. Physiol. 14, 673-687 (1965).

REDFIELD, A. C.: The hemocyanins, Biol. Revs. 9, 175-212 (1934).

----------, INGALLS, E. N.: The oxygen dissoziation curves of some bloods containing hemocyanin. J. Cell. Comp. Physiol. 3, 169-202 (1933).

REDMOND, J. R.: The respiratory function of hemocyanin in crustacea. J. Cell. Comp. Physiol. 46, 209-247 (1955).

----------: Oxygen-hemocyanin relationships in the land crab, Cardisoma guanhumi. Biol. Bull. 122, 252-262 (1962a).

----------: The respiratory characteristics of chiton hemocyanins. Physiol. Zool. 35, 304-313 (1962b).

----------:The respiratory function of hemocyanin. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghiretti ed.), p. 5-23. London and New York: Academic Press 1968.

REYNOLDS, J., TANFORD, C.: The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245, 5161-5165 (1970).

ROSSI FANELLI, A., ANTONINI, E.: Oxygen equilibrium of haemoglobin from Thunnus thynnus. Nature 186, 895-896 (1960).

SHAPIRO, A. L., VINUELA, E., MAIZEL, J. V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820 (1967).

SPOEK, G. L., BAKKER, H., WOLVEKAMP, H. P.: Experiments on the haemocyanin-oxygen equilibrium of the blood of the edible snail (Helix pomatia L.). Comp. Biochem. Physiol. 12, 209-221 (1964).

STEDMAN, E., STEDMAN, E.: Hemocyanin. Part II. The influence of hydrogen ion concentration on the dissociation curve of the oxyhemocyanin from the blood of the common lobster (Homarus vulgaris). Biochem. J. 20, 938-948 (1926a).

STEWART, D. M., MARTIN, A. W.: Blood and fluid balance of the common tarantula, Dugesiella hentzi. Z. vergl. Physiol. 70, 223-246 (1970).

TANFORD, C., PAIN, R. H., OTCHIN, N. S.: Equilibrium and kinetics of the unfolding of lysozyme (Muramidase) by guanidine hydrochloride. J. Mol. Biol. 15, 489-504 (1969).

VAN BRUGGEN, E. F. J.: Electron microscopy of hemocyanins. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghiretti ed.), p. 37-48. London and New York: Academic Press 1968.

----------, SCHUITEN, V., WIEBENGA, E. H.: Structure and properties of hemocyanins III. Electron micrographs of hemocyanin from different gastropoda and crustacea. J. Mol. Biol. 7, 249-253 (1963).

VAN HOLDE, K. E., COHEN, L. B.: Physical studies of hemocyanins. I. Characterization and subunit structure of Loligo pealei hemocyanin. Biochem. 3, 1803-1808 (1965).

WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

WITTERS, R., LONTIE, R.: Stability regions and amino acid composition of gastropod haemocyanins. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghiretti ed.), p. 61-73. London and New York: Academic Press 1968.

WYMAN, J.: Heme proteins. Adv. Prot. Chem. 4, 407-531 (1948).

---------: Linked funktions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. Adv. Prot. Chem. 19, 223-286 (1964).

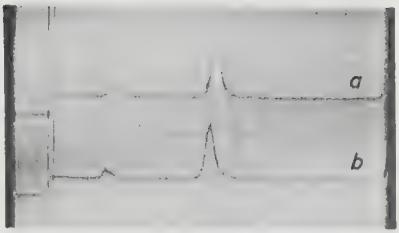

Abbildung 1. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 5,8 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 900 sec, 50 000 Upm

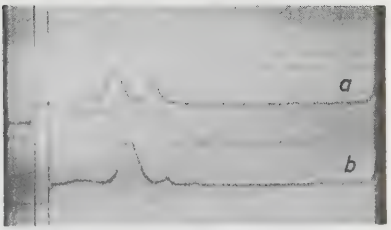

Abbildung 2. Sedimentationsdiagramm von Cupiennius-Hämocyanin bei pH 5,8 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 1 100 sec, 50 000 Upm

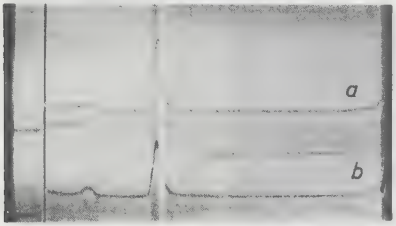

Abbildung 3. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 8,85 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 600 sec, 50 000 Upm

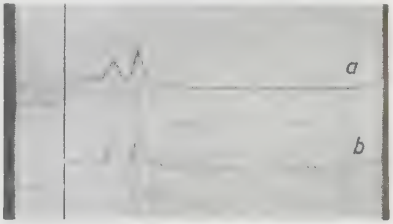

Abbildung 4. Sedimentationsdiagramm von Cupiennius-Hämocyanin bei pH 8,4 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 700 sec, 50 000 Upm

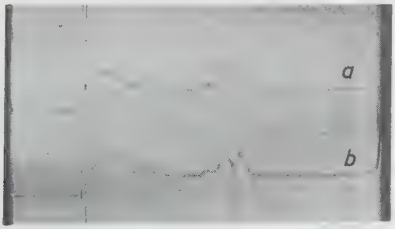

Abbildung 5. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin a) pH 9,10, b) pH 9,17; Laufzeit 850 sec, 50 000 Upm

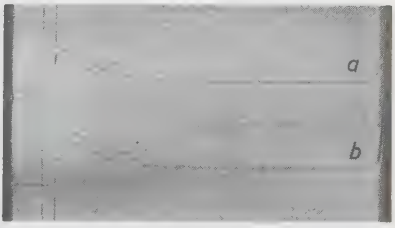

Abbildung 6. Sedimentationsdiagramm von Cupiennius-Hämocyanin a) pH 9,10, b) pH 9,17; Laufzeit 900 sec, 50 000 Upm

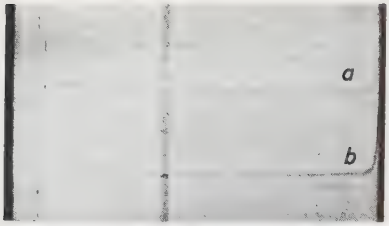

Abbildung 7. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 10,3 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 700 sec, 50 000 Upm

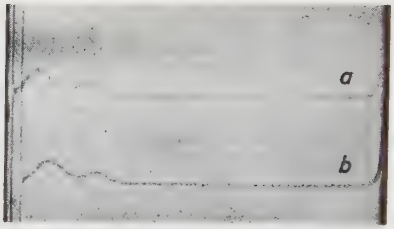

Abbildung 8. Sedimentationsdiagramm von Cupiennius-Hämocyanin bei pH 10,0 a) mit Mg^{++}, b) ohne Mg^{++}; Laufzeit 1 000 sec; 50 000 Upm

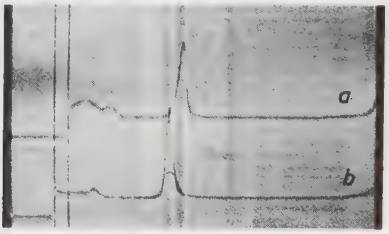

Abbildung 9. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin bei pH 8,75 a) Apohämocyanin, b) Hämocyanin; Laufzeit 700 sec, 50 000 Upm

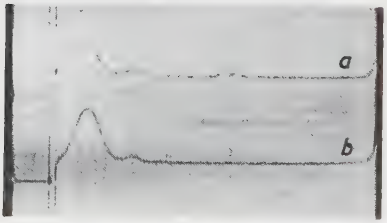

Abbildung 10. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin: Reaggregationsversuch a) pH 10,2 + Mg^{++}, b) Kontrolle; Laufzeit 1 100 sec, 50 000 Upm

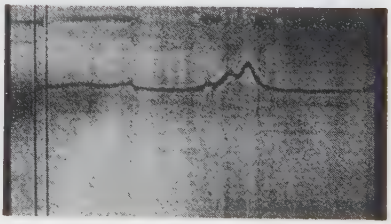

Abbildung 11. Sedimentationsdiagramm von Dugesiella-Hämocyanin: Reaggregationsversuch, pH 7,0; Laufzeit 1 200 sec, 50 000 Upm

Abbildung 12. Elektronenmikroskopie von Dugesiella-Hämocyanin, pH 7,5, Übersicht; Primärvergrößerung 59 600

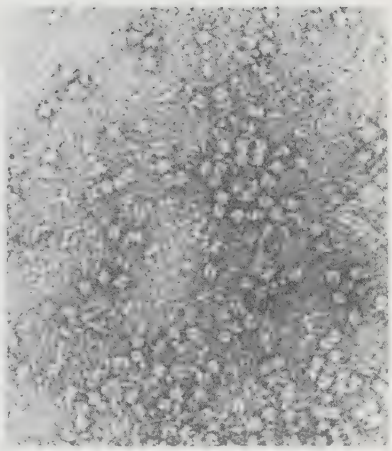

Abbildung 13. Elektronenmikroskopie von Cupiennius-Hämocyanin, pH 7,5, Übersicht; Primärvergrößerung 59 600

Abbildung 14. Elektronenmikroskopie von Dugesiella-Hämocyanin, pH 9,2, Übersicht; Primärvergrößerung 59 600

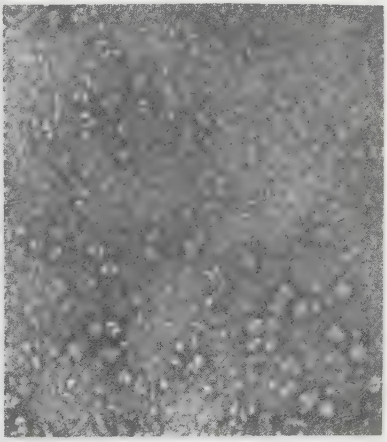

Abbildung 15. Elektronenmikrokopie von Cupiennius-Hämocyanin, pH 9,2. Übersicht; Primärvergrößerung 59 600

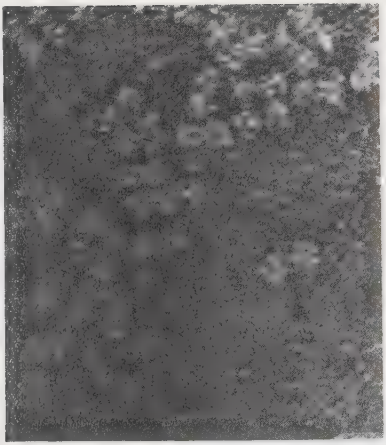

Abbildung 16. Elektronenmikroskopie von Dugesiella-Hämocyanin, pH 7,5; a: Dimer (Hexagon/Hexagon); Primärvergrößerung 110 000

Abbildung 17. Elektronenmikroskopie von Dugesiella-Hämocyanin, pH 7,5; a: Dimer (Hexagon/Rechteck); Primärvergrößerung 59 600

Abbildung 18. Elektronenmikroskopie von Cupiennius-Hämocyanin, pH 7,5; a: Dimer (Hexagon/Rechteck), b: hexagonales -, c: quadratisches -, d: rechteckiges Monomer; Primärvergrößerung 59 600

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 22. 11. 1942 in Würzburg als Tochter des Hauptlehrers Ferdinand Weber und seiner Ehefrau Anna geboren. Die Volksschule besuchte ich in Detwang bei Rothenburg von 1949 bis 1954, daran anschließend die Oberrealschule Rothenburg o/T. Dort legte ich im Juli 1963 das Abitur ab. Im November des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Biologie an der Universität München. Im Wintersemester 1967/68 legte ich die Prüfungen für das Vordiplom (Zoologie, Botanik, Genetik, Chemie) und das Hauptdiplom (Zoologie, Biochemie, Genetik, Chemie) ab. Im Sommer 1969 beendete ich die Diplomarbeit (Thema: Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, Cupiennius salei Keyserling) und begann die vorliegende Promotionsarbeit. Ich bin seit 1968 verheiratet.